

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LES BACILLES DE KOCH INCOMPLÈTEMENT ÉVOLUÉS
DANS LA BACILLÉMIE
AU COURS DE LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE
DU COBAYE ET DU LAPIN

par L. NÈGRE et J. BRETEY (*).

(*Institut Pasteur.*)

La recherche des bacilles de Koch dans le sang des animaux et de l'homme tuberculeux a donné des résultats très différents suivant que les auteurs ont, pour mettre en évidence ces germes, employé l'hémoculture ou l'inoculation du sang au cobaye.

A. Calmette [1], dans son livre sur l'*Infection bacillaire*, donne, d'après 53 auteurs qui ont pratiqué des hémocultures sur le milieu de Löwenstein dans les diverses formes de la tuberculose humaine, une proportion de 1,10 p. 100 de résultats positifs. A. Saenz [2], qui a effectué 936 hémocultures sur le même milieu, n'a eu aussi que 1,2 p. 100 de succès. Par contre, dans les cas où la recherche des bacilles de Koch a été effectuée par inoculation directe du sang de malades tuberculeux au cobaye, il semble que la proportion des résultats positifs ait été plus élevée puisque, pour certains auteurs, elle a pu atteindre et même dépasser le chiffre de 30 p. 100.

Les différences constatées dans ces résultats doivent en partie provenir de ce que l'inoculation du sang au cobaye est une technique un peu plus sensible que son ensemencement sur les

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 février 1954.

milieux à l'oeuf pour y révéler la présence de bacilles tuberculeux. Mais dans l'inoculation du sang au cobaye un autre facteur doit entrer en jeu.

J. Valtis et J. Missiewicz [3], puis F. Arloing et A. Dufourt ont montré qu'il est possible, dans une proportion assez élevée de cas, d'obtenir la forme atypique de l'infection tuberculeuse du cobaye décrite par A. Calmette et J. Valtis [4] en inoculant à cet animal des échantillons de sang filtré ou non filtré sur bougies Chamberland L2 provenant de malades tuberculeux.

Se fondant sur ces faits, A. Calmette [5], ainsi que E. Sergent, M. Durand, R. Kourilsky et R. Benda [6] ont émis l'hypothèse d'une granulémie prébacillaire dans certains états pathologiques relevant de la tuberculose.

Dans des travaux récents [7], après avoir fait la preuve qu'il n'y a pas d'ultravirus tuberculeux et que l'hypothèse des auteurs précédents doit par conséquent être rejetée, nous avons montré qu'il existe cependant une infection tuberculeuse abortive du cobaye produite par l'inoculation à cet animal de certains produits pathologiques et que cette tuberculose atypique caractérisée par l'apparition d'une allergie transitoire avec une légère hypertrophie de certains groupes ganglionnaires et de la rate sans caséification et sans lésions histologiques spécifiques est due non à un ultravirus, mais à des bacilles tuberculeux jeunes incomplètement évolués. Ils sont caractérisés par leur teneur en lipoïdes trois fois moins élevée que celle des bacilles tuberculeux normaux (J. Asselineau [8]), leur faible acido-résistance ou l'absence de cette dernière, leurs pouvoirs pathogène, allergisant et toxique très inférieurs à ceux des germes dont la constitution chimique est complète (L. Nègre, A. Boquet et J. Valtis [9]).

J. Bretey [10] a pu réaliser l'infection tuberculeuse abortive du cobaye par l'inoculation à cet animal d'un seul bacille tuberculeux jeune.

On doit donc désormais tenir compte de cette forme légère de la tuberculose du cobaye dans le diagnostic de l'infection bacillaire et en particulier dans l'étude de la bacillémie où tant de mystères subsistent encore.

Pour ces raisons, nous avons été incités à reprendre l'étude de la bacillémie expérimentale du cobaye et du lapin à la lumière de ces faits nouveaux.

Nos expériences ont porté sur des lapins et sur des cobayes qui ont été inoculés sous la peau avec une dose faible (1) de ba-

(1) Divers auteurs ont vu que, lorsqu'on emploie une dose forte de bacilles de Koch virulents, les germes inoculés passent immédiatement dans la circulation. Par contre, lorsque les cobayes ont été inoculés avec une dose faible (0,001 ou 0,0001 mg), les bacilles tuberculeux n'apparaissent dans le sang que quelques jours après l'infection.

cilles tuberculeux virulents humains ou bovins. Ils ont été saignés à divers intervalles après leur inoculation. Leur sang a été directement inoculé sous la peau de la cuisse droite de trois cobayes, à raison de 2 cm³ environ par animal. L'apparition de l'allergie a été surveillée par des intradermo-réactions pratiquées à divers intervalles chez ces animaux (0,1 cm³ de la dilution à 1/20 de tuberculine brute). Ces cobayes ont été sacrifiés dans des délais de deux à quatre mois après leur inoculation. Chaque fois qu'ils présentaient avec une sensibilité à la tuberculine une hypertrophie de leurs ganglions sous-lombaires ou trachéo-bronchiques et que leur rate était hypertrophiée avec un aspect granuleux sans avoir de lésions nodulaires, ces organes étaient prélevés, broyés au mortier, ensemencés sur le milieu de Löwenstein-Jensen après un traitement par la soude et, dans un grand nombre de cas, inoculés directement à trois cobayes sans traitement préalable. On a pratiqué un examen microscopique des frottis des ganglions ou de la rate pour la recherche des bacilles de Koch et parfois un examen histologique de ces organes effectué par M. Bablet ou M. J. Levaditi.

EXPÉRIENCES SUR LES LAPINS. PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — Quatre lapins ont été inoculés par la voie sous-cutanée avec 0,01 mg d'une souche d'origine humaine très virulente. Ils ont été saignés un, trois, sept et onze jours après leur inoculation. Chaque cobaye a reçu 2 cm³ de sang d'un lapin préalablement infecté. Les résultats sont exposés dans le tableau I. L'infection

TABLEAU I. — Cobayes inoculés avec 2 cm³ de sang de lapins ayant reçu sous la peau 0,01 mg de bacilles humains.

	Délai saignée après inoc.	Intradermo Jours	Résultats	Délai autopsie après inoc.	Lésions	Culture	Réinocula-	Résultats
<u>1er lapin</u>	1 j.	44	+	64 j.	gal.s.l. hyper. rate hyper. granul.	-	-	I.t.a.
	"	"	+	"	id.	-	+	"
	"	"	+	77 j.	id..	-	-	"
	"	"	+	64 j.	rate hyper. granul.	-	-	"
	"	"	-	64 j.	-	-	-	-
<u>2ème lapin</u>	3 j	42	+	64 j.	rate hyper. granul.	+		Tuberc.
	"	"	+	50 j.	-			
<u>3ème lapin</u>	7 j.	72	+	79 j.	gal.s.l. rate hyper.	+		Tuberc.
<u>4ème lapin</u>	22 j.	60	-	60 j.	-	-		-
	"	-	-	-	-	-		-
	"	-	-	-	-	-		-

tuberculeuse abortive est désignée en abrégé par les lettres I. t. a.

On voit que le sang de lapins infectés par la voie sous-cutanée

avec une souche de bacilles tuberculeux d'origine humaine peu virulente pour ces animaux a, dans le cas du prélèvement effectué vingt-quatre heures après l'inoculation, allergisé quatre des cinq cobayes auxquels il a été inoculé. Chez les allergiques, nous avons observé une hypertrophie des ganglions sous-lombaires et de la rate. Mais l'ensemencement de ces organes sur le milieu de Löwenstein-Jensen et leur inoculation à trois cobayes n'ont donné aucun résultat positif pour la tuberculose.

Les cobayes inoculés avec les échantillons de sang de lapins prélevés trois et sept jours après l'inoculation sont devenus tuberculeux.

Au vingt-deuxième jour, il n'y avait pas de bacilles circulant dans le sang.

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — Des lapins ont été inoculés sous la peau avec 0,01 mg de la souche d'origine humaine 512. Ils ont été saignés deux, quatre, huit et quinze jours après leur inoculation. Pour chaque prélèvement, six cobayes ont été inoculés avec 2 cm³ de sang, trois dans la veine et trois sous la peau.

Ils ont été éprouvés par injection intradermique de tuberculine vers le quarantième, le quatre-vingtième et le cent quarantième jour après leur inoculation. Dans les lots de cobayes qui ont reçu le sang *par la voie veineuse*, une réaction allergique (+) a été constatée à l'épreuve du cent quarantième jour chez un cobaye inoculé avec le sang prélevé le deuxième jour après l'inoculation, une autre (+) à la même date chez un cobaye inoculé avec du sang prélevé le huitième jour et une autre (++) à la même date chez un cobaye inoculé avec le sang prélevé le quinzième jour. Celui-ci a présenté une réaction allergique plus forte que celles des deux cobayes précédents et a été sacrifié quatre mois et demi après son inoculation.

Il n'avait pas de lésions macroscopiques. Malheureusement les ganglions et la rate des trois cobayes devenus allergiques n'ont pas été ensemencés, ni inoculés à d'autres cobayes.

Aucun des cobayes inoculés dans les mêmes conditions que les précédents, mais par la voie sous-cutanée, n'a réagi positivement à la tuberculine.

Nous ne pouvons tirer aucune conclusion de cette série d'expériences, mais nous devons noter les différences qui se sont manifestées entre les deux groupes de cobayes suivant la voie d'inoculation du sang employée.

EXPÉRIENCES SUR LES COBAYES. PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — Des cobayes ont été inoculés sous la peau avec 0,001 mg de bacilles tuberculeux d'origine humaine. Ils ont été saignés par ponction cardiaque à divers intervalles après leur inoculation.

Chaque échantillon de sang prélevé a été inoculé sous la peau de la cuisse droite de trois cobayes à raison de 2 cm³ par animal.

TABLEAU II. — Cobayes inoculés par la voie sous-cutanée avec 2 cm³ de sang de cobayes ayant reçu sous la peau 0,001 mg de bacilles tuberculeux bovins.

	Délai saignée après inoc.	Intradermo Jours Résultats	Délai autopsie après inoc.	Lésions	Culture	Réinocu- lation	Résultats
I	7 h.	45 : - 105 : + " : +	111 j. 111 j.	- ggl.s.l. hyper. ggl.tr.br. hyper.	-	-	I.t.a.
II	24 h.	61 : - " : - " : - " : - " : -	72 j. " " " "	- - - - -	-	-	-
III	24 h.	61 : -	63 j.	-	-	-	-
IV	24 h.	63 : - " : -	64 j. " "	- -	-	-	-
V	24 h.	63 : -	63 j.	-	-	-	-
VI	36 h.	63 : -	65 j.	-	-	-	-
VII	36 h.	61 : - " : -	113 j. " "	- -	-	-	-
VIII	48 h.	60 : - " : - " : -	60 j. " " " "	- - -	-	-	-
IX	48 h.	68 : +	71 j.	ggl.s.l. hyper.	-	-	I.t.a.
X	3 j.	52 : ++ nécrot. " : ++ " : ++	62 j. " " " "	tuberc. rate id. id.	+	+	Tuberc. id. id.
XI	3 j.	49 : ++ " : - " : -	65 j. " " " "	tub.généralisée	+	-	Tuberc. - -
XII	3 j.	62 : -	62 j.	-	-	-	-
XIII	4 j.	63 : +	65 j.	-	-	-	I.t.a.
XIV	4 j.	66 : -	87 j.	-	-	-	-
XV	4 j.	66 : -	68 j.	-	-	-	-
XVI	25 j.	99 : + 154 : +++	154 j.	ggl.s.l. hyper. rate granul. hyper.	-	-	I.t.a.
XVII	25 j.	99 : - 154 : -	154 j.	-	-	-	-

On voit que, dans l'expérience I (sang de cobaye prélevé sept heures après l'inoculation à animal de bacilles tuberculeux virulents), les deux cobayes inoculés avec cet échantillon de sang sont devenus allergiques (allergie constatée au bout de trois mois). L'un d'eux avait ses ganglions sous-lombaires et trachéobronchiques hypertrophiés. L'ensemencement de ces ganglions et de la rate et leur inoculation à trois cobayes sont restés négatifs pour la tuberculose.

Trois autres cobayes inoculés avec trois échantillons de sang

différents sont devenus allergiques sans présenter de lésions tuberculeuses :

1^o Le cobaye IX inoculé avec du sang prélevé quarante-huit heures après son inoculation ;

2^o Le cobaye XIII inoculé avec du sang prélevé quatre jours après son inoculation ;

3^o Le cobaye XVI inoculé avec du sang prélevé vingt-cinq jours après son inoculation.

Deux d'entre eux ont présenté une hypertrophie de leurs ganglions :

Cobaye IX (ganglion sous-lombaire) ;

Cobaye XVI (ganglion sous-lombaire et rate hypertrophiée et granuleuse).

Tous les trois, même ce dernier qui avait une forte intradermoréaction à la tuberculine positive (+++), ont eu des ensemencements de leurs ganglions et de leurs rates négatifs.

Les trois cobayes de l'expérience X, inoculés avec du sang prélevé trois jours après l'inoculation et un cobaye sur quatre (exp. XI et XII), inoculés avec des échantillons de sang prélevés également trois jours après l'inoculation, sont devenus tuberculeux.

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — Au lieu de prendre, pour infecter les cobayes, des cultures de bacilles tuberculeux, nous avons employé la rate d'un cobaye tuberculeux qui avait été inoculé sous la peau avec des bacilles d'origine humaine et dont la tuberculose était en pleine évolution.

Cette rate a été broyée, mise en suspension en eau physiologique et inoculée sous la peau de cobayes. Ces derniers ont été saignés par ponction cardiaque à divers intervalles après leur inoculation. Chaque échantillon de sang prélevé a été inoculé à la dose de 2 cm³ sous la peau de trois cobayes.

Il ressort du tableau III que les échantillons de sang des cobayes (prélèvements effectués dix-huit, vingt-quatre et quarante-huit heures après leur infection) inoculés à des cobayes sains ont allergisé trois de ces animaux sur huit en provoquant en même temps une hypertrophie de certains ganglions ou de leur rate.

Les échantillons de sang de cobayes infectés dont les prélèvements ont été effectués quatre, sept et onze jours après l'inoculation de ces derniers et qui ont été inoculés à des cobayes sains, ont conféré la tuberculose à six cobayes sur huit. On remarquera que la sensibilité à la tuberculine a été aussi longue à se manifester chez ces derniers que chez ceux ayant présenté une infection tuberculeuse abortive.

Les cinq cobayes inoculés avec les échantillons de sang prélevés

TABLEAU III. — Cobayes inoculés par la voie sous-cutanée avec 2 cm³ de sang de cobayes ayant reçu sous la peau une suspension en eau physiologique de rate d'un cobaye tuberculeux.

	Délai saignée après inoc.	Jours	Intradermo Résultats	Délai autopsie après inoc.	Lésions	Culture	Réinoculation	Résultats
I	18 h.	43:- 79:- 146:+ 187:+		188 j.	Rate granul. hyper.	-	-	I.t.a.
	"	" :-		106 j.		-	-	
	"	" :+ nécrot.(1)		80 j.	Début lésions	+	-	Tuberc.
II	24 h.	43:- 79:- 146:- 187:-		191 j.	-	-	-	
	"	" :- " :+ " :+		191 j.	-	-	-	I.t.a.
III	48 h.	42:- 78:-		128 j.	-	-	-	
	"	" :-		91 j.	-	-	-	
	"	" :+ "		106 j.	g.ing. et s.l. hyper.	-	-	I.t.a.
IV	4 j.	40:- 76:+		173 j.	Tub.généralisée		Tuberc.	
	"	" :-		80 j.		-	-	
V	7 j.	37:- 73:+ 140:+ nécrot.		170 j.	Tub.généralisée		Tuberc.	
	"	" :- " :+ nécrot.		170 j.	id.		Tuberc.	
	"	" :+ "		75 j.	-	-	-	
VI	11 j.	49:- 69:+ nécrot.		108 j.	Tub. généralisée		Tuberc.	
	"	" :+ "		143 j.	id.		Tuberc.	
	"	" :+ "		103 j.	id.		Tuberc.	
VII	15 j.	61:- 87:- 137:-		137 j.	-	-	-	
VIII	22 j.	51:- 77:-		107 j.	-	-	-	
	"	" :-		81 j.	-	-	-	
IX	32 j.	41:- 67:- 120:-		80 j.	-	-	-	
	"	" :- " :-		80 j.		-	-	

les quinzième, vingt-deuxième et trente-deuxième jours après l'infection des cobayes qui ont fourni ce sang n'ont eu ni des lésions évolutives, ni une infection abortive.

TROISIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — Comme dans la première série d'expériences, des cobayes ont été inoculés sous la peau avec des bacilles tuberculeux non d'origine humaine mais d'origine bovine, à la dose de 0,001 mg. Ils ont été saignés par ponction cardiaque quatre, dix et dix-sept jours après leur inoculation. Chaque échantillon de sang a été inoculé sous la peau de la cuisse droite de cinq cobayes (2 cm³ par animal).

Nous n'avons pas pu avoir de résultats avec les cobayes inoculés avec les échantillons de sang prélevés le dixième jour. Ils sont tous morts trop prématurément.

Si nous ne retenons que les cobayes qui ont réagi nettement à la tuberculine, nous avons obtenu deux résultats positifs pour une infection tuberculeuse abortive avec l'échantillon de sang prélevé le quatrième jour après l'infection et avec celui prélevé le dix-septième jour.

Dans toutes ces expériences la plupart des cobayes qui ont réagi positivement à la tuberculine avec une intensité plus ou moins prononcée sans avoir de lésions nodulaires ont présenté une hypertrophie de leurs ganglions sous-lombaires ou trachéobronchiques

TABLEAU IV. — Cobayes inoculés par la voie sous-cutanée avec 2 cm³ de sang de cobayes ayant reçu sous la peau 0,001 mg de bacilles tuberculeux bovins.

	Délai semaine après inoc.	Intradermo Jours Résultats	Délai autopsie après inoc.	Lésions	Culture	Réinocu- lation	Résultats
I	4 j.	49 : + 80 : +	99 j.	Petit g.s.l. g.tr.br. très hyper	-	-	I.t.a.
II	"	49 : -	63 j.	-	-	-	-
III	"	49 : - 80 : E	100 j.	Petit g.s.l. Rate granul.	-	-	-
IV	"	49 : -	50 j.	-	-	-	-
V	"	49 : - 80 : +	90 j.	g.s.l. hyper.	-	-	I.t.a.
VI	17 j.	35 : - 73 : +	87 j.	g.s.l. hyper. rate granul.	-	-	I.t.a.
VII	"	35 : - 73 : -	87 j.	g.s.l. et tr.br. hyper.	-	-	-
VIII	"	35 : - 73 : E	87 j.	g.s.l. et tr.br. hyper. rate granul.	-	-	-
IX	"	35 : - 73 : -	87 j.	-	-	-	-

et, dans la plupart des cas, de leur rate. Chez presque tous, l'allergie n'a apparu que plus de deux mois après l'inoculation de sang.

DISCUSSION.

Pour mieux nous rendre compte des résultats obtenus chez les cobayes inoculés avec des échantillons de sang de cobayes et de lapins infectés avec des bacilles tuberculeux virulents d'origine humaine ou bovine, nous les avons récapitulés dans le tableau V qui nous a permis, aux différentes périodes suivant l'inoculation virulente, de voir le nombre des cobayes tuberculés et celui des cobayes ayant présenté une infection tuberculeuse abortive et, pour chaque période, d'établir la proportion de ces animaux.

On voit dans ce tableau que dans les deux premiers jours après l'infection des cobayes et des lapins par des bacilles de Koch virulents il ne circule dans le sang que des bacilles tuberculeux incomplètement évolués, incapables de conférer des lésions tuberculeuses aux cobayes auxquels les échantillons de sang ont été inoculés, mais capables tout au plus de leur donner une infection tuberculeuse abortive.

Entre le troisième et le quatrième jour, les bacilles tuberculeux virulents apparaissent dans le sang ; les bacilles incomplètement évolués y sont encore présents, mais moins nombreux. A partir du septième jour, les bacilles incomplètement évolués ont disparu, tandis que les bacilles virulents augmentent jusqu'au onzième

TABLEAU V. — Résultats généraux obtenus par l'inoculation à des cobayes d'échantillons de sang prélevés chez des cobayes et des lapins dans divers délais après leur infection.

Délais des prélevements de sang après l'inoculation	Nbre total d'animaux inoculés	Proportion des cobayes inoculés avec le sang devenus tuberculeux	Nombre de cobayes ayant présenté une infection tub. abortive
7 heures	2	0	1 : 50 %
18 heures	3	0	1 : 33 %
24 - 36 heures	19	0	5 : 26 %
2 jours	7	0	2 : 28 %
3 - 4 jours	19	6 : 31 %	3 : 16 %
7 jours	4	3 : 75 %	0 : 0
11 jours	3	3 : 100 %	0 : 0
15 jours	1	0 : 0	0 : 0
17 jours	4	0 : 0	1 : 25 %
22 jours	5	0 : 0	0 : 0
25 jours	2	0 : 0	1 : 50 %
32 jours	2	0 : 0	0 : 0
	71	12	14

jour puis disparaissent à leur tour. Au dix-septième et au vingt-cinquième jour, il y a eu cependant des réapparitions de bacilles incomplètement évolués.

On voit donc que les bacilles tuberculeux virulents normaux succèdent aux bacilles incomplètement évolués qui les précèdent et dont ils sont donc issus.

Il ressort de nos recherches que c'est surtout pendant les trois ou quatre premiers jours après l'inoculation virulente que le sang du cobaye et du lapin contient des bacilles tuberculeux incomplètement évolués, n'ayant pas encore acquis leur virulence normale. A partir du quatrième jour après l'inoculation virulente, les germes incomplètement évolués ne paraissent circuler dans le sang que par intermittences.

On peut voir dans les divers tableaux que l'allergie provoquée chez le cobaye par l'inoculation du sang d'animaux préalablement infectés, contenant des germes incomplètement évolués, est presque toujours accompagnée d'une hypertrophie soit de certains ganglions (ganglions sous-lombaires et trachéobronchiques), soit de la rate qui a un aspect granuleux, soit des deux à la fois. Dans chaque cas, l'ensemencement sur le milieu de Löwenstein-Jensen de ces organes et leur inoculation au cobaye sont restés négatifs. La recherche des bacilles de Koch est en général négative. Il n'y a pas lieu de s'en étonner puisqu'il doit s'agir de rares bacilles jeunes non acido-résistants. Les examens histologiques ne montrent pas de lésions spécifiques comme l'ont constaté nos collègues Bablet et Jean Levaditi.

On pourrait supposer que si les animaux allergiques avaient été maintenus plus longtemps en observation, ils seraient devenus tuberculeux.

Nous pouvons répondre à cette objection que, dans de nombreux cas, nous avons vu l'allergie disparaître de même que l'hypertrophie ganglionnaire.

D'autre part, s'il s'agissait du début d'une infection par des bacilles tuberculeux normaux, l'ensemencement des ganglions sur le milieu de Löwenstein-Jensen et leur inoculation au cobaye devraient donner des résultats positifs pour la tuberculose alors qu'il n'en a jamais été ainsi.

Il nous est arrivé très rarement, dans d'autres recherches, de trouver des cobayes réagissant spontanément à la tuberculine sans avoir été infectés. Cependant dans des cas semblables, l'ensemencement de leurs ganglions sur le milieu de Löwenstein-Jensen a donné une culture de bacilles tuberculeux.

Nous pouvons en outre faire remarquer, comme en témoignent nos tableaux, que chez les cobayes inoculés avec des échantillons de sang d'animaux infectés, l'allergie apparaît sensiblement en même temps après cette inoculation, aussi bien dans les cas où ils ont eu uniquement une infection tuberculeuse abortive que dans ceux où ils ont été tuberculisés, ce qui montre qu'il ne s'agit que d'une différence dans la virulence des germes se trouvant dans le sang au moment du prélèvement et non d'une cause fortuite étrangère à l'inoculation qui leur a été faite.

Une autre preuve de la réalité de notre interprétation est donnée par le degré de l'allergie. De même que l'un de nous a montré avec A. Boquet et J. Valtis que les bacilles tuberculeux jeunes ont un plus faible pouvoir sensibilisant à la tuberculine que les bacilles complètement évolués, nous avons constaté que dans le cas où les cobayes inoculés avec des échantillons de sang ont eu uniquement une infection abortive, l'allergie est en général de faible intensité. Ce n'est que dans de rares cas que cette dernière a été aussi forte que dans une infection déterminée par des bacilles virulents. Mais même dans les cas où les cobayes inoculés avec un échantillon de sang ont eu une allergie d'une très forte intensité, l'ensemencement des ganglions hypertrophiés et de la rate sur le milieu de Löwenstein-Jensen et leur inoculation au cobaye sont restés négatifs pour la tuberculose. Cette constatation fournit la preuve que ce n'est pas une allergie provoquée par des bacilles normaux, car chez des animaux très fortement allergisés, on devrait trouver de nombreux bacilles.

Pour toutes ces raisons nous pensons que nos expériences n'ont pas été entachées par une cause d'erreur et que le sang des animaux expérimentalement infectés contient régulièrement au début de l'infection et plus tard par intermittences, au cours de l'infec-

tion, des bacilles incomplètement évolués qui n'ont pas la virulence des bacilles normaux.

Ces résultats sont du reste confirmés par ceux que nous avons obtenus par l'étude de la bacillémie en clinique humaine. Nous avons vu que c'est surtout dans des cas de primo-infection manifestée par un érythème noueux qu'on met en évidence dans le sang avec le plus de fréquence des germes incomplètement évolués.

CONCLUSIONS.

Par l'inoculation au cobaye du sang de lapins ou de cobayes préalablement infectés par la voie sous-cutanée avec des doses faibles de bacilles de Koch d'origine humaine et bovine, nous avons pu démontrer que des bacilles tuberculeux incomplètement évolués, de faible virulence, se rencontrent dans la circulation sanguine de ces animaux, surtout pendant les quatre premiers jours après l'infection. Au bout de ce délai, on n'en rencontre plus que par intermittences.

A ces bacilles incomplètement évolués succèdent immédiatement des bacilles tuberculeux à virulence normale qui ne peuvent être issus que des précédents.

La présence dans le sang de ces bacilles incomplètement évolués ne peut pas être décelée par son ensemencement sur le milieu de Löwenstein, sur lequel ils ne sont pas capables de se développer, mais par son inoculation au cobaye. La faible virulence de ces germes ne leur permet pas de donner à ce dernier une tuberculose évolutive mais une infection abortive caractérisée par une allergie, en général de faible intensité, presque toujours accompagnée d'une hypertrophie sans caséification des ganglions sous-lombaires et trachéobronchiques et d'une hypertrophie de la rate qui a un aspect granuleux.

Ces faits jettent un jour nouveau sur la bacillémie tuberculeuse démontrant qu'elle est plus fréquente qu'on ne le pensait. En effet, dans les périodes où on ne peut pas mettre en évidence des bacilles de Koch dans le sang des sujets et des animaux tuberculeux par son ensemencement sur le milieu de Löwenstein-Jensen et par son inoculation au cobaye avec apparition de lésions nodulaires, on y trouve des bacilles incomplètement évolués à virulence atténuee. Dans des travaux récents, nous avons montré le rôle que ces derniers germes jouent en clinique humaine dans la dissémination des bacilles de Koch dans les divers organes [1].

BIBLIOGRAPHIE

[1] A. CALMETTE. *L'infection bacillaire et la tuberculose*, 4^e édition, par A. Boquet et L. Nègre, Masson et C^{ie}, Paris, 1936, p. 384.

- [2] A. SAENZ. *Ces Annales*, 1934, **52**, 645.
- [3] J. VALTIS et J. MISSIEWICZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 7.
- [4] A. CALMETTE et J. VALTIS. *Ann. Méd.*, 1926, **19**, 553.
- [5] A. CALMETTE in *L'infection bacillaire et la tuberculose*, 4^e édition, Masson et C^{ie}, édit., 1936, p. 122.
- [6] E. SERGENT, M. DURAND, R. KOURILSKY et BENDA in *L'infection bacillaire et la tuberculose*, 4^e édition. Masson et C^{ie}, édit., 1936, p. 122.
- [7] L. NÈGRE et J. BRETEY. *Ces Annales*, 1952, **82**, 1 et **82**, 132.
- [8] J. ASSELINEAU. *Ces Annales*, 1951, **81**, 306.
- [9] L. NÈGRE, A. BOQUET et J. VALTIS. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 45 et 129 ; **101**, 541. — L. NÈGRE. *Ces Annales*, 1930, **44**, 247 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **146**, 936 ; *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **224**, 305 ; *Ces Annales*, 1947, **73**, 713 ; *Les lipoïdes dans les bacilles tuberculeux et la tuberculose*, 1 vol., 140 p. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1950.
- [10] J. BRETEY. *Rev. Tuberc.*, 1943, **8**, 163.
- [11] L. NÈGRE et J. BRETEY. *Bull. Acad. Médecine*, 1954, **138**, 46 ; *La Presse Médicale*, 1954, **62**, 621.

**MICROMÉTHODE DE SÉRONEUTRALISATION
DE LA POLIOMYÉLITE.
EMPLOI DE CULTURES CELLULAIRES
SUR PLAQUES MOULÉES DE MATIÈRE PLASTIQUE**

par G. BARSKI et P. LÉPINE (*).

(*Institut Pasteur, Service des Virus.*)

L'importance de la recherche des anticorps neutralisants dans la poliomyélite clinique ou inapparente a été démontrée par d'innombrables travaux portant soit sur le diagnostic individuel, soit sur l'épidémiologie ou l'immunologie de cette affection.

L'intérêt pratique d'un test de séroneutralisation dont la technique serait simple, rapide et sûre n'a pas besoin d'être souligné. Seule, en effet, une méthode pouvant être appliquée sur une échelle étendue permettrait de résoudre le problème du dépistage des individus ne possédant pas d'anticorps neutralisants, problème ayant du point de vue épidémiologique une importance indéniable.

Jusqu'à ces dernières années il était nécessaire d'utiliser des animaux pour le test de séroneutralisation du virus poliomyélitique : singes pour les types I et III, ou souris pour le type II [1, 2, 3, 4]. Depuis les travaux d'Enders, Weller et Robbins [5, 6], il est devenu possible d'adapter à ce test des cellules d'origine humaine ou simienne cultivées *in vitro*. C'est la méthode des tubes roulants (roller tubes) qui a été et qui est encore pratiquement la plus employée.

L'exécution du test en tubes roulants exige d'abord la préparation d'un nombre important de tubes de cultures de tissus humains ou de singe, chaque tube constituant une unité du test. La préparation de ces cultures, c'est-à-dire l'obtention dans chaque tube d'une croissance cellulaire suffisante demande normalement sept à dix jours, et plusieurs opérations d'entretien et de contrôle. Dans un second temps, le sérum à éprouver est incubé avec les trois types du virus respectivement, puis introduit dans les tubes avec les cultures.

La méthode que nous décrivons ci-après réduit les trois opéra-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} avril 1954.

tions à une seule : la mise en culture des cellules sensibles, l'épreuve de neutralisation du virus avec le sérum étudié, et la mise des cellules en présence du mélange virus-sérum se font en un seul temps ; la réponse est obtenue en quarante-huit heures.

En outre, il s'agit là d'une micro-réaction, ce qui la rend particulièrement économique : le volume de sérum nécessaire pour son exécution est réduit à une goutte par épreuve, c'est-à-dire à quatre gouttes au total, y compris le témoin. La quantité de cellules et le volume du milieu sont également réduits au minimum dans les mêmes proportions. De ce fait on fait jouer au sérum un rôle double : il participe par ses anticorps à la réaction de neutralisation du virus, mais en même temps, par sa présence, il complète le milieu et y joue un rôle essentiel pour la croissance et l'état des cellules.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE.

Pour parvenir à une réalisation pratique, il a fallu résoudre au départ plusieurs problèmes d'ordre technique : 1^o disposer d'un matériel cellulaire facilement et régulièrement accessible, de croissance très rapide et d'une grande sensibilité au virus ; 2^o concevoir un milieu de culture qui assurerait aux cellules une bonne croissance et une stabilité morphologique (absence de dégénérescence non spécifique) sous un volume très réduit et cela pendant assez longtemps pour que l'effet cytopathogène spécifique puisse se produire d'une façon significative ; 3^o trouver la forme et la matière d'un dispositif à récipients multiples permettant l'exécution de tests en série et une lecture facile et directe des résultats.

CULTURES CELLULAIRES. — Nous avons décrit dans un travail récemment paru [7] les conditions dans lesquelles nous obtenons des lignées cellulaires repiquables à partir des tissus musculo-sous-cutanés prélevés à l'autopsie chez les nouveau-nés (surtout chez les prématurés de six à huit mois). Rappelons que le milieu utilisé (nommé M27) se compose de 20 p. 100 de sérum placentaire humain, de 45 p. 100 de liquide amniotique de vache (1), de 10 p. 100 d'extrait embryonnaire de bovin et de 25 p. 100 de solution de Hanks. La composition de ce milieu a été adoptée à la suite de très nombreux essais de comparaison comme répondant le mieux aux exigences d'une croissance cellulaire très rapide, accompagnée d'un minimum de dégénérescence non spécifique des cellules. Le départ de la culture primaire est

(1) Le liquide amniotique de vache, préparé d'après la formule d'Enders [8], nous est fourni commercialement par les Laboratoires Renard, 32, avenue Henri-Barbusse, à Clichy (Seine).

relativement lent et ce n'est qu'au 2^e ou 3^e repiquage que l'on obtient des cultures de fibroblastes très abondantes et qui prolifèrent avec une très grande rapidité. Les repiquages se font tous les dix à quinze jours avec un matériel cellulaire réduit mécaniquement à l'état d'une suspension que l'on coule dans une mince couche de plasma de façon à obtenir une croissance aussi uniforme que possible. Ces cultures constituent notre stock de matériel cellulaire destiné à la réaction, et nous le renouvelons constamment.

Le matériel cellulaire pour le test est préparé de la même façon que pour les repiquages: après prélèvement et lavage dans un excès de solution de Hanks, toute la zone de croissance est réduite, à l'aide d'instruments très tranchants, en une poussière très fine et suspendue dans un mélange à parties égales d'extrait embryonnaire de bovin (EEB) et de liquide amniotique (LA). Pour une plaque comprenant 25 unités de test il suffit de 2 à 3 tubes.

VIRUS. — Nous utilisons pour nos tests des suspensions des trois souches-types du virus : Mahoney (type I), MEF 1 (type II) et Saukett (type III). Ces suspensions proviennent des cultures cellulaires en milieu recommandé par Enders [8], nommé plus loin ME, et contenant 90 p. 100 de liquide amniotique de vache, 5 p. 100 de sérum de cheval et 5 p. 100 d'extrait embryonnaire de bovin. Après centrifugation pendant quinze minutes à 5 000 t/min les suspensions sont distribuées en ampoules et stockées à — 75°C. Leur pouvoir infectant qui varie entre 10⁻⁴ et 10⁻⁵, se maintient pratiquement inchangé pendant plusieurs mois.

RÉCIPIENTS EN MATIÈRE PLASTIQUE. — Pour pouvoir envisager une exécution rapide des tests en séries, il était nécessaire de remplacer les tubes de cultures par des plaques creusées d'alvéoles, disposés en rangées, chaque alvéole constituant une unité de test. Pour la confection des plaques, notre choix s'est porté sur une matière plastique, l'Araldite B, qui est une résine éthyoxylque polymérisée [9].

Cette matière possède certaines qualités spéciales que nous exposerons plus en détail dans une autre publication [18]. Remarquons seulement que l'Araldite B s'est montrée dépourvue de toute toxicité pour les cellules vivantes qui peuvent proliférer directement contre sa surface, ce qu'il nous a été impossible d'obtenir avec le Plexiglas. De plus, l'Araldite possède la qualité précieuse de pouvoir supporter sans altération une stérilisation à 100-110°C. Le moulage de cette matière est relativement facile et nous avons pu réaliser des plaques de 120 × 120 mm, de 8 mm d'épaisseur, portant chacune 25 alvéoles à fond plat de 10-12 mm de diamètre, distants les uns des autres de 10 mm (voir fig. 1).

L'Araldite est suffisamment translucide pour qu'on puisse, à travers son épaisseur, observer au microscope (grossissant cinquante à cent fois) les cellules qui se trouvent au fond des alvéoles. Malgré la teinte jaune de la matière l'image est d'une netteté entièrement satisfaisante. Les dimensions de la plaque (120×120 mm) permettent de la poser sans difficulté sur la platine du microscope et de l'examiner sur toute sa surface.

Dosage. — Tous les constituants du test : suspension cellulaire,



FIG. 1. — Plaque d'Araldite utilisée pour le test de séro-neutralisation.
La première rangée d'alvéoles est fermée avec une bande de cellophane adhésive.

sérum, suspensions virulentes, milieu, sont dosés par gouttes avec des pipettes Pasteur à bout calibré. Le calibrage est fait à l'aide du dispositif décrit par Lépine et collaborateurs [17]. Chaque goutte contient 38 à 40 mm³ de liquide.

EXÉCUTION DU TEST. — On commence l'opération en mouillant avec un tampon stérile, imbibé de plasma de poule, le fond de tous les alvéoles de la plaque; on ajoute aussitôt après une micro-goutte d'extrait embryonnaire dilué (25 p. 100) dans chacun d'eux. On agite légèrement la plaque : quelques instants après la coagulation du plasma, on dépose dans chaque alvéole

une goutte de suspension tissulaire, préparée à l'avance. Puis, selon un schéma opératoire établi, on ajoute dans les alvéoles, par rangées horizontales, les sérum à tester à raison d'une goutte par alvéole, et par rangées verticales dans les trois premières rangées à raison également d'une goutte, les suspensions virulentes de type I, II et III. La quatrième rangée verticale, réservée au témoin, reçoit une goutte du milieu ME. Pour compléter le tout et donner au milieu une composition proche de celle du M27,



FIG. 2. — Prolifération cellulaire normale observée au microscope (gross. 180 fois) au fond d'un alvéole de la plaque d'essai en présence d'un sérum contenant des anticorps : pas d'effet cytopathogène.

nous ajoutons dans chaque alvéole 2 gouttes d'un mélange contenant 80 p. 100 de liquide amniotique (LA), 20 p. 100 de solution de Hanks, 200 UO de pénicilline et 50 µg de streptomycine par centimètre cube.

Pour fermer les alvéoles et les isoler les uns des autres, nous appliquons sur chaque rangée horizontale une bande de cellophane adhésive (scotch-tape) qui adhère très bien à la surface de l'Araldite, à condition que celle-ci soit sèche. Le contact qui s'établit parfois entre le contenu des alvéoles et la surface de l'adhésif n'influence aucunement l'état des cellules. L'adhérence de l'adhésif

à l'Araldite résiste bien à la température de l'étuve et l'étanchéité ainsi que la séparation des alvéoles au cours de l'essai sont parfaitement assurées. La plaque entière est recouverte d'une lame de verre ayant les mêmes dimensions que la plaque d'Araldite elle-même, et ajoute une sécurité supplémentaire.

On incube les plaques ainsi préparées à 37°C, et on procède à la lecture des résultats après quarante-huit heures.

RÉSULTATS. — La suspension cellulaire utilisée pour le test est



FIG. 3. — Aspect de cellules (même gross. que fig. 2) dans un alvéole où le sérum ne contenait pas d'anticorps spécifiques : dégénérescence cellulaire par l'action cytopathogène du virus.

composée de petits agglomérats cellulaires et, ce qui est inévitable, de quelques fragments de plasma « vides » ne contenant pas de cellules. Pourtant, le matériel cellulaire étant réduit en « poussière », la répartition des cellules viables est suffisamment uniforme pour qu'elles soient représentées dans chaque alvéole en nombre suffisant. Leur croissance au fond des alvéoles, dans un milieu qui ne diffère pratiquement pas du M27 est extrêmement rapide : au bout de vingt-quatre heures elle est déjà considérable et après quarante-huit heures elle couvre habituellement environ

la moitié de la surface de l'alvéole. En l'absence de virus actif, l'état des cellules est très satisfaisant pendant quatre à cinq jours. Mais déjà au bout de quarante-huit heures, dans les alvéoles où le virus n'a pas été neutralisé les signes de son action cytopathogène sont des plus manifestes : la migration des cellules à partir de fragments est réduite et les cellules présentent l'aspect caractéristique d'une dégénérescence spécifique très avancée (voir fig. 2 et 3).

Nous avons effectué, à titre de vérification, d'une part à l'aide de cette méthode, et d'autre part parallèlement à l'aide de la méthode des tubes roulants, 72 tests de séroneutralisation avec des sérum humains. Les résultats ont été dans tous les cas identiques.

DISCUSSION.

Nos propres observations [10] ainsi que celles d'autres auteurs [11, 12], ont démontré la possibilité d'obtenir avec des cellules très sensibles mises en présence du virus poliomyélitique un effet cytopathogène rapide qu'on peut distinguer au bout de vingt-quatre à quarante huit heures.

Il est à souligner que les cellules précultivées, adaptées à la vie *in vitro*, présentent toujours deux avantages majeurs par rapport aux tissus fraîchement explantés: 1° elles manifestent une activité de migration cellulaire et de croissance très élevée, qui commence pratiquement immédiatement après le repiquage ; 2° leur sensibilité au virus, évaluée d'après le point final de titrage et la rapidité d'apparition de l'effet cytopathogène s'avère toujours plus élevée qu'elle ne l'est pour les tissus fraîchement prélevés [7].

Les tentatives d'emploi de suspensions de cellules prélevées directement sur l'organisme et en particulier de suspensions de cellules d'ascite artificielle de singe, nous ont donné dans ce sens des résultats franchement négatifs. Des suspensions du tissu rénal de singe ou d'homme se sont révélées également moins favorables au but que nous recherchions que les cellules provenant des cultures de plusieurs repiquages. En revanche, la souche cellulaire He La (2), isolée par Gey en 1951 d'un carcinome humain, cultivée depuis *in vitro* [13] et très sensible au virus poliomyélitique [12], semble bien se prêter comme matériel cellulaire à la méthode que nous décrivons.

Il est admis que la fixation du virus sur la cellule est pratiquement impossible en présence des anticorps neutralisants spéci-

(2) Cette souche nous a été aimablement envoyée par le Dr Charlotte Friend du Sloan Kettering Inst. de New-York et par le Dr Audrey Fjelde du Statens Serum Institut de Copenhague.

fiques. Dans un travail récent, M. Ledinko et J. L. Melnick [14] ont démontré, en particulier, qu'en ce qui concerne le virus poliomyétique *in vitro*, la probabilité de sa fixation sur des cellules sensibles est réduite au minimum dans le cas précis où le virus et le sérum contenant des anticorps sont introduits simultanément dans la culture cellulaire. Nous confirmons pleinement ces résultats et cette constatation se trouve à la base de notre technique.

Le fait qu'au moment de la mise en marche de l'essai le matériel cellulaire soit à l'état de suspension libre facilite très certainement dans une grande mesure les interactions cellules-virus et cellules-anticorps. La protection des cellules par les anticorps spécifiques doit se faire, semble-t-il, très rapidement, puisque dans aucun des 120 cas de nos essais où les anticorps contre le type donné de virus étaient présents dans le sérum, le virus n'a pu produire un effet cytopathogène malgré sa concentration très élevée.

Remarquons encore que l'agitation pendant une heure du mélange cellules-sérum-virus-milieu au moment de la mise en route de la réaction s'est révélée à l'essai inutile et nous l'avons abandonnée.

Nous ne pouvons pour l'instant donner des appréciations quantitatives définitives concernant les limites de sensibilité de notre test. Il nous est pourtant possible d'apporter quelques précisions établies empiriquement.

Au moment où l'on met le sérum en présence du virus, il est dilué dans la proportion 1 : 5, ce qui correspond approximativement aux conditions de séroneutralisation, pratiquée avec d'autres méthodes [14].

La concentration des suspensions de virus que nous employons est particulièrement élevée. Cette concentration nous semble utile pour obtenir un effet cytopathogène aussi rapide et complet que possible, mais il n'est pas exclu que l'on puisse l'abaisser sans inconvénient. D'après nos observations, tout sérum éprouvé par cette méthode et qui contenait des anticorps empêchait l'effet cytopathogène du virus correspondant d'une façon très nette malgré la concentration élevée du virus. Dans tous nos essais la méthode classique des tubes roulants nous a servi de test de référence.

Ajoutons, enfin, que la même méthode nous a donné de bons résultats pour le typage des virus poliomyélitiques récemment isolés, effectué avec des sérum-types préparés sur le singe. Le sérum de singe peut, en effet, remplacer sans inconvénient dans les alvéoles le sérum humain. Par contre, le sérum de cheval accélère l'apparition d'une dégénérescence non spécifique des cellules.

Des tentatives pour exécuter des tests sérologiques en série en

présence de tissus vivants infectés *in vitro* avec un virus ont été entreprises avant nous par Fulton et Armitage [45]. Pourtant, dans la méthode de Fulton et Armitage, qui constitue, en fait, un perfectionnement de la méthode de Maitland adaptée à un travail en série, il ne s'agit pas d'une vraie culture cellulaire, mais plutôt d'une survie de tissu, suffisante pour la multiplication du virus. Fulton et ses collaborateurs n'envisagent pas une observation directe de l'état des cellules dans leurs cultures et pour mettre en évidence la multiplication du virus ils recourent à une seconde opération de titrage, par hémagglutination par exemple [16].

Par contre, notre méthode, qui a l'avantage de réduire tout le test de séro-neutralisation en cultures cellulaires à une seule opération suivie de la lecture des résultats, fait appel à une véritable culture qui assure aux cellules non atteintes par le virus des conditions de bonne prolifération. L'emploi de plaques en Araldite permet de suivre leur état au microscope à chaque instant, sans difficulté et sans perturber la marche de l'essai. Nous pensons que ce dispositif pourra être appliqué utilement à d'autres réactions comportant un système cellules-virus-anticorps.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] D. BODIAN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **72**, 259.
- [2] J. F. ENDERS. *J. Clin. Invest.*, 1944, **23**, 510.
- [3] J. STOKES Jr., *Yale J. Biol. Med.*, 1944, **16**, 415.
- [4] V. PAVILANIS et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1952, **82**, 145 et 1952, **83**, 1.
- [5] J. F. ENDERS, T. H. WELLER et F. C. ROBBINS. *Science*, 1949, **109**, 85.
- [6] T. H. WELLER, F. C. ROBBINS et J. F. ENDERS. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **72**, 153.
- [7] G. BARSKI, P. DE SOUZA, V. MONACI, M. ENDO et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1953, **85**, 576.
- [8] J. F. ENDERS. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1953, **82**, 100.
- [9] E. PREISWERK et von ZEEREDER. *Schweiz. Arch. angew. Wiss. Technik*, 1946, **4**, n° 12.
- [10] G. BARSKI, M. ENDO et V. MONACI. *Ces Annales*, 1953, **85**, 264.
- [11] R. DULBECCO. *Communication personnelle*.
- [12] W. F. SCHERER, J. T. SYVERTON et G. O. GEY. *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 695.
- [13] G. O. GEY, W. D. COFFMAN et M. T. KUBICEK. *Cancer Res.*, 1952, **12**, 264.
- [14] N. LEDINKO et J. L. MELNICK. *Am. J. Hyg.*, 1953, **58**, 223.
- [15] F. FULTON et P. ARMITAGE. *J. Hyg.*, 1951, **49**, 247.
- [16] F. FULTON. *J. Hyg.*, 1952, **50**, 265.
- [17] P. LÉPINE, V. SAUTTER, J. DELPY et F. ARTZET. *Ces Annales*, 1953, **84**, 684.
- [18] G. BARSKI. *Bull. Microsc. appl. (sous presse)*.

**LE VIRUS « COBAYE PULMONAIRE »
AGENT D'UNE PNEUMOPATHIE SPONTANÉE DU COBAYE.
SON INCIDENCE EN PATHOLOGIE HUMAINE**

par AIMÉ PELLISSIER (*).

(Institut Pasteur de Brazzaville.)

En novembre 1948, nous avons constaté dans l'élevage de cobayes de l'Institut Pasteur de Brazzaville l'apparition d'une maladie spontanée, caractérisée par une atteinte pulmonaire plus ou moins grave. La maladie était décelée, le plus souvent, à l'occasion d'inoculations diverses. Mais un certain nombre d'animaux ont fait une maladie spontanément mortelle. Ce virus n'a pas disparu à l'heure actuelle et périodiquement, surtout au moment de la saison fraîche, il se manifeste avec plus ou moins de virulence. La dernière petite poussée date de juin 1952, époque à laquelle nous avons pu isoler une nouvelle souche qui s'est montrée immunologiquement identique à celle isolée en 1948 et qui est entretenue depuis cette date sur souris.

Nous avons appelé virus « cobaye pulmonaire » ce nouveau virus, pour le différencier du virus « cobaye E. R. » qui a fait l'objet d'une précédente communication [1].

L'étude de ce virus présente un certain intérêt. Nous verrons en effet qu'une enquête sérologique chez la population africaine a permis de déceler un pourcentage important de réactions positives vis-à-vis de cet antigène.

POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL.

La souche que nous avons conservée a été obtenue par inoculation intrapéritonéale au cobaye, de lait stérile. Elle a subi deux passages sur cobaye par inoculation de broyat de poumon dans le péritoine. Puis nous avons pratiqué la transmission à la souris par voie intracérébrale et entretenu la souche sur la souris par passages de cerveau à cerveau. Nous avons pratiqué 28 passages chez la souris.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 février 1954.

COBAYE. — La maladie naturelle est ordinairement assez traînante, mais la maladie expérimentale est rapidement mortelle. Après une incubation de deux à quatre jours, la température monte à 40-41°. Elle se maintient en plateau pendant six à huit jours et l'animal meurt en hypothermie. Cliniquement, la maladie ressemble à celle déterminée par le virus « cobaye E. R. » et à la « pneumopathie du cobaye » décrite par Lépine et Sautter [2], mais nous allons voir que les lésions anatomo-pathologiques sont différentes.

L'autopsie, en effet, montre des organes abdominaux tout à fait normaux et il n'existe pas d'xsudat péritonéal. Il n'y a pas d'adénopathies, pas de congestion des organes et, en particulier, la rate paraît normale. Les frottis de péritoine ne montrent pas d'inclusions. Les lésions pulmonaires sont plus ou moins importantes. Le plus souvent, il s'agit de plages rouge lie de vin disséminées sur les deux poumons sans systématisation. Ces plages ont parfois un aspect carminé. Quelquefois, les lésions sont localisées à un lobe et c'est souvent le lobe inférieur. Les poumons sont spumeux à la coupe et flottent sur l'eau. L'examen microscopique confirme l'absence de lésions dans les organes abdominaux : foie, rate et reins. Les poumons présentent, au niveau des plages décelées macroscopiquement, une congestion des capillaires alvéolaires, avec quelques petits raptus hémorragiques ; une alvéolite œdémateuse et des zones d'alvéolite hémorragique. Quelques nodules inflammatoires lymphocytaires péribronchiques sont quelquefois groupés en petit foyers. En résumé, il s'agit d'une image d'œdème aigu du poumon, qui est bien différente des lésions décrites dans la pneumopathie du cobaye de Lépine et Sautter. Nous n'avons pas trouvé d'inclusions.

SOURIS. — Les souris inoculées *dans le péritoine* avec la souche de cobaye présentent une maladie mortelle en six à sept jours, sans signes cliniques particuliers et avec des lésions pulmonaires identiques à celles du cobaye. Actuellement, le virus neurotrophe souris, après 26 passages, n'a plus d'action sur la souris par voie péritonéale.

L'inoculation par *voie intracérébrale* donne une maladie transmissible en série, entraînant la mort de l'animal vers le septième jour et caractérisée par les signes d'une méningo-encéphalite. Il n'y a pas de lésions pulmonaires, mais une méningo-encéphalite à prédominance lymphocytaire, sans caractères histologiques particuliers et sans inclusions.

L'inoculation intrapéritonéale à 2 cobayes de cette souche neurotrophe souris, après son vingt-sixième passage, a donné une maladie fébrile mortelle en huit et douze jours, avec les lésions macroscopiques et microscopiques habituelles au niveau des poumons.

SINGE. — Un singe cercopithèque inoculé dans le péritoine avec la souche de cobaye a présenté une maladie fébrile mortelle, après une incubation de six jours et une réaction fébrile à 40-41° pendant neuf jours. Il n'y avait pas de lésions pulmonaires.

Actuellement, la souche neurotrophe souris n'est pathogène pour le singe cercopithèque que par voie intracérébrale. L'animal fait alors une méningo-encéphalite mortelle en une quinzaine de jours. Il s'agit d'une méningo-encéphalite à prédominance lymphocytaire et sans caractères histologiques particuliers.

LAPIN. — Les lapins inoculés soit avec la souche de cobaye, soit avec la souche neurotrophe, dans le péritoine ou dans le cerveau, ne présentent aucune réaction.

RAT. — Le rat blanc, qui n'était pas sensible à la souche de cobaye, fait une méningo-encéphalite mortelle après inoculation intracérébrale de la souche neurotrophe souris.

CULTURE EN ŒUF EMBRYONNÉ. — Nous avons seulement pratiqué l'inoculation dans le sac vitellin, selon la méthode aveugle classique. Les trois premiers passages n'ont rien donné de net. A partir du quatrième, une mortalité régulière s'est manifestée. Dès le sixième nous avons obtenu la mort de la totalité ou la presque totalité des embryons inoculés, vers le septième jour.

Les lésions histologiques des membranes et de l'embryon n'offrent aucun caractère spécifique. Il s'agit d'œdème et de congestion plus ou moins hémorragique. Nous n'avons pas trouvé d'inclusions.

Après le sixième passage, le virus avait conservé un pouvoir pathogène normal pour la souris.

CARACTÈRES DU VIRUS.

FILTRATION. — La filtration sur Seitz de produit pathologique a été réalisée à trois reprises : deux fois par filtration de sang et une fois par filtration de broyat de poumon de cobaye. Les animaux inoculés ont fait dans tous les cas une maladie expérimentale typique.

ACTIVITÉ. — La souche de cobaye avait au début une activité déjà importante. Le sang, les broyats de poumon, de rate et les émulsions de cerveau étaient actifs à 1/50 000. La souche neurotrophe souris est devenue beaucoup plus active et la dose DL50 pour la souris est obtenue avec une dilution de cerveau à 1/200 000.

CONSERVATION, RÉSISTANCE. — Les cerveaux de souris conservent leur virulence pendant de nombreux mois par stockage au congélateur à -25° . Ils se conservent au moins vingt jours au réfrigérateur.

Il s'agit d'un virus assez résistant, qui n'est détruit qu'après deux heures de chauffage à 60° et deux minutes à 100° . Les antiseptiques, formol à 0,5 p. 100 et acide phénique à 1 p. 100, le détruisent en quelques heures.

ETUDE IMMUNOLOGIQUE.

Pour l'identification immunologique de ce virus, nous l'avons comparé à 32 autres virus neurotropes pour la souris :

- 10 virus isolés en Afrique tropicale ;
- 4 virus isolés en Amérique tropicale ;
- 14 virus neurotropes divers.

La liste de ces virus figure dans les tableaux I et II. Pour les caractéristiques de chacun d'eux, nous renvoyons à notre étude immunologique du virus encéphalomyélite de Brazzaville [3]. Nous avons utilisé d'une part les épreuves de séro-neutralisation croisée au moyen d'anti-sérum expérimentaux et, d'autre part, les épreuves de déviation croisée du complément. Les techniques employées ont été décrites par ailleurs [3].

Les épreuves de séro-neutralisation croisée sur la souris vis-à-vis de 10 DL₅₀ de chaque virus n'ont montré aucune relation immunologique entre le virus « cobaye pulmonaire » et les 32 autres virus. Le tableau I donne les résultats de la séro-neutralisation du virus cobaye pulmonaire par les sérum expérimentaux des autres virus. Le tableau II donne les résultats de la séro-neutralisation de 31 virus par l'anti-sérum expérimental cobaye pulmonaire. Il convient d'y ajouter l'épreuve pratiquée sur deux singes pour la séro-neutralisation du virus encéphalomyélite de Brazzaville.

Les épreuves de la déviation croisée du complément n'ont de même montré aucune relation immunologique entre le virus cobaye pulmonaire et les autres virus étudiés.

Le virus « cobaye pulmonaire » est donc immunologiquement différent des divers virus neurotropes auxquels nous l'avons comparé. Il est en particulier différent du virus « cobaye E. R. » dont nous avons fait récemment l'étude [4], et sur lequel nous ne reviendrons pas.

D'autres virus isolés chez le cobaye ont été décrits, mais les souches n'en ont pas été conservées et nous devons nous en tenir à la description parfois incomplète donnée par les auteurs. Il est d'ailleurs assez difficile de préciser s'il s'agit de plusieurs virus différents ou si plusieurs descriptions se rapportent à un même agent pathogène (Lépine [5]).

TABLEAU I. — Epreuves de séro-neutralisation
du virus « cobaye pulmonaire ».

ANTI-SERUMS	Virus "Cob. Pulmonaire" actif à 1/200.000					
	1000	500	100	10	I.	
	DL 50	DL 50	DL 50	DL 50	DL 50	
Sérum lapin normal.....						2/4
Virus d'A.E.F.						
Encéphalomyélite Brazza.....					0/4	
Allenopithècus.....					0/4	
Cobaye E.R.					0/8	
Cobaye Pulmonaire.....	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	
Ictere épidémique.....					0/4	
Afrique tropicale.						
Amaril Dakar.....					0/4	
Rift Valley Fever.....					0/4	
Bwamba Fever.....					0/4	
West Nile.....					1/4	
Semliki Forest.....					0/4	
Bunyamwera.....					0/4	
N' Taya.....					1/4	
Mengo.....					0/4	
Zika.....					1/4	
Uganda S					0/4	
Amérique tropicale.						
Anopheles A					0/4	
Anopheles B					0/4	
Wyeomyia.....					0/4	
Ilheus.....					0/4	
Virus divers.						
Encéphalomyocarditique..					1/4	
E.M.A. de l'EST.....					0/4	
E.M.A. de l'OUEST.....					0/4	
E.M.A. du VENEZUELA.....					0/4	
Encéphal. Saint-Louis.....					0/4	
Encéphal. Japonaise B ..					0/4	
Encéphal. Russes.....					0/4	
Louping-Ill.....					0/4	
Polio. Lansing.....					1/4	
Polio. MEF I					0/4	
Theiler GD VII					0/4	
Chorio-méningo-lymph..					0/4	
Méningo-Pneumonie.....					0/4	
Nicolas-Favre.....					0/4	

numérateur = souris vivantes ; dénominateur = souris inoculées

La maladie décrite par Roemer [6] est une méningo-encéphalomyélite donnant chez le cobaye une paraplégie flasque. Il s'agit donc de manifestations pathologiques tout à fait différentes.

La peste du cobaye de Gasperi et Sangiorgi [7] présente des analogies avec la maladie de Roemer, il n'est pas signalé de lésions pulmonaires et le virus n'est pas pathogène pour la souris.

Le virus décrit par Jonesco-Mihaiesti [8] donne cliniquement chez le cobaye une maladie tout à fait comparable à celle que nous avons décrite. Mais les lésions constatées à l'autopsie sont absolument différentes. On observe en effet une dégénérescence du foie avec foyers de nécrose blanchâtre, une hypertrophie des

TABLEAU II. — Epreuves de séro-neutralisation
de divers virus par l'anti-sérum « cobaye pulmonaire ».

VIRUS	Inoculation	Activité	Nb. de DL 50	Anti-sérum neutralisées	Cob. Pulmonaire	par anti-sérum vis-à-vis	homologue IO DL 50
<u>Virus d'A.E.F.</u>							
Allenopithacus.....	I.C.	I/10.000	100	1	0/4		
Cobaye E.R.	I.C.	I/500.000	500	1	0/8		
Cobaye Pulmonaire.....	I.C.	I/200.000	1000	1	4/4		
Ictere épidémique.....	I.C.	I/600.000	1000	1	0/4		
<u>Afrique tropicale.</u>							
Amaril Dakar.....	I.C.	I/800.000	1000	1	0/4		
Rift Valley Fever.....	I.C.	I/50 millions	1000	1	0/4		
Bwamba Fever.....	I.C.	I/200.000	1000	1	0/4		
West Nile.....	I.C.	I/10 millions	500	1	0/4		
Semliki Forest.....	I.P.	I/20 millions	1000	1	0/4		
Bunyanwera.....	I.C.	I/5 millions	500	1	1/4		
N' Taya.....	I.C.	I/800.000	500	1	0/4		
Mengo.....	I.P.	I/30 millions	1000	1	0/4		
Zika.....	I.C.	I/I million	500	1	0/4		
Uganda S	I.C.	I/400.000	1000	1	1/4		
<u>Amérique tropicale.</u>							
Anopheles A	I.C.	I/300.000	500	1	0/4		
Anopheles B	I.C.	I/300.000	500	1	0/4		
Wyeomyia.....	I.C.	I/800.000	500	1	0/4		
Illiheus.....	I.C.	I/20 millions	500	1	0/4		
<u>Virus divers.</u>							
Encéphalomyocarditique.....	I.P.	I/20 millions	1000	1	1/4		
E.M.A. de l'EST	I.C.	I/100 millions	500	1	0/4		
E.M.A. de l'OUEST	I.C.	I/100 millions	500	1	0/4		
E.M.A. du Venezuela.....	I.C.	I/50 millions	1000	1	0/4		
Encéphal. Saint-Louis.....	I.C.	I/100 millions	1000	1	0/4		
Encéphal. Japonaise B	I.C.	I/100 millions	1000	1	0/4		
Encéphal. Russe.....	I.C.	I/50 millions	500	1	1/4		
Louping-Ill.....	I.C.	I/8 millions	500	1	0/4		
Polio. Lansing.....	I.C.	I/600	50	1	0/4		
Polio. MEF I	I.C.	I/600	50	1	1/4		
Theiler GD VII	I.C.	I/5 millions	100	1	0/4		
Chorio-méningite-lymph.....	I.C.	I/50.000	500	1	0/4		
Méningo-Pneumonie.....	I.C.	I/50.000	500	1	0/4		
Nicolas-Favre.....	I.C.	I/50.000	500	1	1/4		

I.C. = intracérébrale

I.P. = intraperitoneale

numérateur = souris vivantes

dénominateur = souris inoculées

ganglions et des surrénales, qui atteignent un volume considérable.

Il nous reste enfin à différencier le virus « cobaye pulmonaire » de celui de la « pneumopathie du cobaye », qui est en réalité immunologiquement identique au virus de la chorio-méningite lymphocytaire (Lépine et M^{me} Sautter [2], Blanc [9]).

Cliniquement, les maladies expérimentales chez le cobaye sont comparables, mais nous avons vu que les lésions histologiques sont tout à fait différentes. Nous avons vu également que les études immunologiques avec les sérums expérimentaux, par la séro-neutralisation croisée et par la déviation croisée du complé-

ment, ont montré qu'il n'y avait aucune relation immunologique entre le virus « cobaye pulmonaire » et celui de la chorio-méningite lymphocytaire. La souche de ce dernier virus qui a été utilisée pour ces épreuves est la souche W. E. isolée en 1936 par Rivers et Scott [10] et que nous a envoyée J. E. Smadel.

Enfin, un dernier argument, s'il en est besoin, qui confirme la séparation de ces deux virus, est donné par les résultats obtenus dans l'enquête sérologique systématique que nous avons effectuée sur les sérum d'Africains d'A. E. F. Nous allons voir ci-dessous l'incidence du virus « cobaye pulmonaire » en pathologie humaine, et nous pouvons dire que si nous avons trouvé 62 sérum réagissant avec le virus « cobaye pulmonaire », par contre, nous avons trouvé un seul sérum présentant des anticorps pour le virus de la chorio-méningite lymphocytaire, et ces résultats sont obtenus sur plus de 800 sérum examinés.

L'individualité immunologique du virus « cobaye pulmonaire » nous semble donc suffisamment démontrée.

INCIDENCE EN PATHOLOGIE HUMAINE.

Nous nous sommes livré à une enquête sérologique par la réaction de déviation du complément sur la population africaine de l'A. E. F. Nous avons utilisé les divers antigènes que nous avions préparés pour les épreuves d'identification des virus isolés à Brazzaville. Les résultats de cette enquête seront donnés par ailleurs. Nous rapporterons seulement ici les résultats obtenus avec l'antigène « cobaye pulmonaire » :

	SÉRUMS examinés	POSITIFS
Moyen-Congo	600	38
Oubangui	140	13
Tchad	156	11
Total.	896	62 soit 6,9 p. 100.

Ces résultats doivent faire admettre l'incidence humaine importante de ce virus et il y a tout lieu de penser qu'il se manifeste chez l'homme, comme chez le cobaye, par des signes pulmonaires. Il serait donc intéressant, à l'avenir, d'examiner systématiquement les sérum des malades présentant des affections respiratoires plus ou moins atypiques.

CONCLUSIONS.

Nous avons isolé un virus agent d'une pneumopathie spontanée du cobaye, et dont la mise en évidence, par exaltation de la virulence, s'est faite le plus souvent à l'occasion d'inoculations diverses. Par passages successifs chez le cobaye on obtient une

maladie fébrile rapidement mortelle et caractérisée par des lésions pulmonaires à type œdème aigu du poumon.

Par adaptation au cerveau de souris nous avons obtenu une souche neurotrophe souris qui tue régulièrement l'animal vers le septième jour, avec des signes de méningo-encéphalite à prédominance lymphocytaire. Ce virus neurotrophe est également pathogène, par voie intracérébrale, pour le rat et pour le singe.

Après 26 passages de cette souche neurotropic souris, l'inoculation intrapéritonéale au cobaye reproduit la maladie fébrile originale, avec localisations pulmonaires.

Par les épreuves de séro-neutralisation croisée et de déviation croisée du complément, nous avons comparé ce virus à 32 autres virus neurotropes divers. Aucune relation immunologique n'a été décelée entre le virus cobaye pulmonaire et les autres virus. Il se montre en particulier différent du virus « cobaye E. R. » isolé également à Brazzaville et du virus de la « pneumopathie du cobaye », qui est immunologiquement identique à celui de la chorio-méningite lymphocytaire.

Une enquête sérologique menée chez la population africaine de l'A. E. F. montre un pourcentage de près de 7 p. 100 de résultats positifs avec l'antigène « cobaye pulmonaire ». On doit donc conclure à l'incidence humaine importante de ce virus, mais il nous est encore impossible de préciser sous quelles manifestations cliniques il se présente.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. PELLISSIER. Ces *Annales*, 1953, **85**, 724.
- [2] P. LÉPINE et M^{me} V. SAUTIER. Ces *Annales*, 1945, **71**, 103.
- [3] A. PELLISSIER. Ces *Annales*, 1954, **86**, 53.
- [4] A. PELLISSIER. Ces *Annales*, 1953, **85**, 724.
- [5] P. LÉPINE. *Maladies des cobayes*, in C. LEVADITI, P. LÉPINE et J. VERGE. *Les Ultraviruses des maladies animales*. Maloine, édit., Paris, 1948.
- [6] P. M. ROEMER. *Deut. Med. Wochenschr.*, 1911, **37**, 1209.
- [7] F. DE GASPERI et G. SANGIORGI. *Zentralbl. Bakt.*, 1913, **71**, 257.
- [8] JONESCO-MIHAIESTI. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **84**, 1014.
- [9] G. BLANC. *Sem. Hôp.*, 1952, **28**, 3805.
- [10] T. M. RIVERS et T. F. M. SCOTT. *J. exp. Med.*, 1936, **63**, 415.

DÉVELOPPEMENT DU VIRUS GRIPPAL ET pH DU LIQUIDE ALLANTOÏQUE

II. — RÉCEPTIVITÉ DE LA MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏQUE A L'INFECTION ET DÉVELOPPEMENT DU VIRUS SUIVANT L'ÂGE DE L'EMBRYON ET LE pH DU LIQUIDE ALLANTOÏQUE

par B. FAUCONNIER (*).

(*Institut Pasteur. Centre National de la Grippe.
Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.*)

Depuis que de nombreux auteurs ont montré les variations survenant dans les valeurs du pH du liquide allantoïque de l'œuf de poule embryonné normal [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7] ou infecté de virus grippal [8, 9, 10, 11, 12], nous nous sommes attaché à étudier de plus près les détails de ces variations.

Dans un récent travail [13], nous avons montré : 1° Que le virus pouvait se développer lorsqu'il était inoculé dans un liquide allantoïque légèrement et naturellement acide, mais que la limite inférieure du pH du liquide compatible avec l'infection était rapidement atteinte et voisine de pH 6. 2° Que si l'infection survenait, le pH du liquide allantoïque remontait d'une manière caractéristique et constante jusqu'aux environs de la neutralité. Deux phénomènes bien distincts sont ainsi définis. Cette étude ne concerne qu'un aspect du premier d'entre eux.

Le fait que, d'une part, le virus perd la propriété de se développer dans un liquide allantoïque ayant un pH inférieur à 6 et que, d'autre part, au fur et à mesure de son vieillissement, le liquide allantoïque des œufs embryonnés s'acidifie jusqu'à des valeurs voisines de pH 5,5 et même inférieures, amène à penser qu'il existe une relation étroite entre le pourcentage d'embryons capables d'être infectés par voie allantoïque et l'âge de ces mêmes embryons. En effet, il est maintenant connu qu'il existe de grandes variations individuelles de pH allantoïque parmi des œufs du même âge et incubés de la même manière, et ceci particulièrement à partir du douzième ou treizième jour. Les plus grandes variations peuvent être enregistrées vers le quatorzième ou quinzième jour où certains œufs ont un pH allantoïque encore

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 mars 1954.

voisin de pH 8, alors que d'autres en ont déjà un aux environs de pH 5,5. Il est donc logique de penser que chaque jour un plus grand nombre d'embryons deviendront réfractaires à l'infection par voie allantoïque du fait de la valeur trop basse du pH de leur liquide.

MATÉRIEL ET MÉTHODES EMPLOYÉS.

Œufs embryonnés : œufs de Leghorn incubés à 38,5°.

Souche de virus grippal : une souche A — PR8 entretenue au

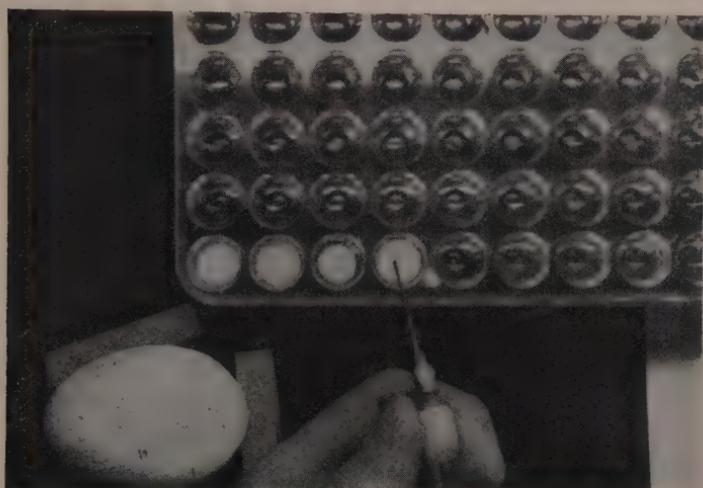


FIG. 1.

laboratoire par passage sur œuf, et dont le titre 50 p. 100 infectant pour l'embryon de dix jours est de 10^{-8} .

Ponction du liquide allantoïque de l'œuf embryonné et détermination du pH de ce liquide : l'œuf est miré, et le point de ponction choisi est le même que celui déterminé pour l'inoculation intra-allantoïque. Après désinfection de la surface de la coquille à l'alcool, on perce un petit orifice avec un stylet et on ponctionne quelques gouttes de liquide allantoïque (0,4 ml) au moyen d'une seringue de 1 ml munie d'une aiguille spéciale. Cette aiguille, décrite par Green et Freyman [14] présente, outre son orifice terminal, deux ou trois orifices supplémentaires étagés sur les parois latérales au voisinage de l'extrémité. Elle doit mesurer 40 mm de long et 12/10 mm de diamètre pour que la ponction soit facile à tous les âges de l'embryon. Chaque liquide

recueilli est déposé dans l'une des cupules d'un plateau en matière plastique (fig. 1). A chaque œuf correspond une cupule. La plaque rapidement remplie, on détermine le pH de chaque liquide avec un électro-pH-mètre (Heito) muni d'une micro-électrode de verre (fig. 2). Si l'on désire ensuite rechercher par hémo-agglutination la présence ou l'absence de virus dans chaque liquide ainsi prélevé, il suffit d'ajouter quelques gouttes de globules rouges de poulet à 0,5 p. 100 dans chaque cupule.

I. — pH ALLANTOÏQUE ET RÉCEPTIVITÉ EMBRYONNAIRE A L'INFECTION VIRALE.

EXPÉRIMENTATION. — Des lots d'une quarantaine d'œufs

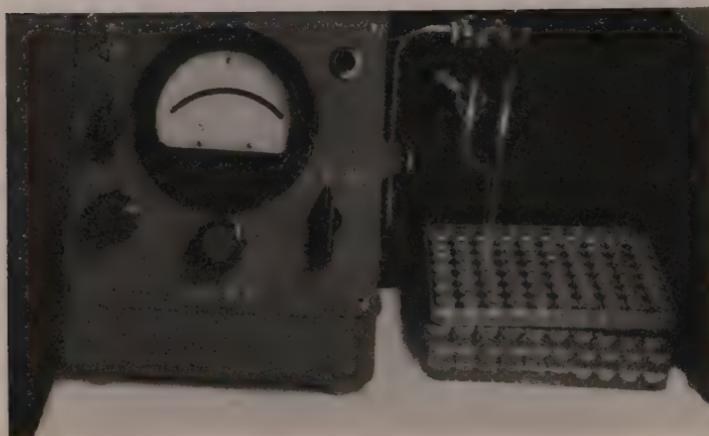


FIG. 2.

embryonnés âgés de 12, 13, 14, 15, 16 et 17 jours sont ponctionnés stérilement, et le pH du liquide allantoïque de chacun est déterminé. Puis tous les œufs sont inoculés par voie allantoïque avec une souche A PR8 diluée à 10^{-6} . Après un séjour de quarante-huit heures à l'étuve à 37°, ils sont de nouveau ponctionnés individuellement et la présence du virus est recherchée qualitativement dans chaque liquide par hémo-agglutination. Les œufs morts au moment du prélèvement ne sont pas compris dans les résultats.

RÉSULTATS ET DISCUSSION (tableau I et fig 3).

Le pH moyen des œufs neufs (avant inoculation) descend fortement à partir du douzième ou treizième jour à mesure que les

TABLEAU I.

	A	B	C	D	E	F	G	H
jour	I2	35	7,5I	88,9	II,I	8,6	0	3
jour	I3	37	7,II	8I	I9	I3,5	0	5
jour	I4	42	6,7I	54,7	45,3	28,56	0	I2
jour	I5	37	6,4I	48,6	5I,4	37,8	I	I5
jour	I6	39	6,40	48	52	35,9	0	I4
jour	I7	I3	6,II	7	93	53,8	0	7
Totaux.....							I	56

A-age des œufs au moment de l'inoculation.

B-nombre d'œufs utilisés.

C-pH moyen des liquides all.avant inoculation.

D-pourcentage des liquides all.+ à l'hémo-agglutin.

E-pourcentage des liquides all.0 à l'hémo-agglutin.

F-pourcentage des liquides all.dont le pH est inférieur à 6 au moment de l'inoculation.

G-nombre de liquides all.à pH inférieur à 6 qui sont devenus + à l'hémo-agglutination.

H-nombre de liquides all.à pH inférieur à 6 au moment de l'inoculation.

œufs vieillissent (courbe 1). Le phénomène caractéristique et normal est maintenant bien connu. Parallèlement on constate que le pourcentage des œufs dont le liquide allantoïque est infecté (hémo-agglutination positive) décroît de jour en jour (courbe 2). A 90 p. 100 à douze jours, il n'est plus qu'à 7,7 p. 100 à dix-sept jours. La courbe 3 montre dans quelle mesure et pour quelle raison la réceptivité du liquide allantoïque à l'infection est fonction de son pH. Cette courbe indique en effet que le pourcentage des œufs dont le pH allantoïque est inférieur à 6 augmente dans un rapport de proportions semblable à celui où l'infection ne s'est pas développée. Or, sur les 56 œufs au total qui, au moment de l'inoculation, avaient un pH allantoïque inférieur à 6, un seul (pH 5,9) s'est montré réceptif à l'infection. Le fait que le pourcentage des œufs à pH allantoïque inférieur à 6, donc incompatible avec l'infection, augmente à mesure que les œufs vieillissent, explique dans sa plus grande part la diminution de réceptivité consécutive des œufs à partir du dixième ou

douzième jour d'incubation. Cependant, il ne semble pas tout expliquer, puisque la courbe 4 (œufs négatifs) n'est pas superposable à la courbe 3 (œufs à pH allantoïque inférieur à 6). Un certain nombre d'œufs dont le pH du liquide allantoïque est supérieur à 6 au moment de l'inoculation, n'est pas infecté. Nous avons déjà donné, par ailleurs [13], l'explication du phénomène, en montrant que l'inoculation n'arrête pas la chute du pH du

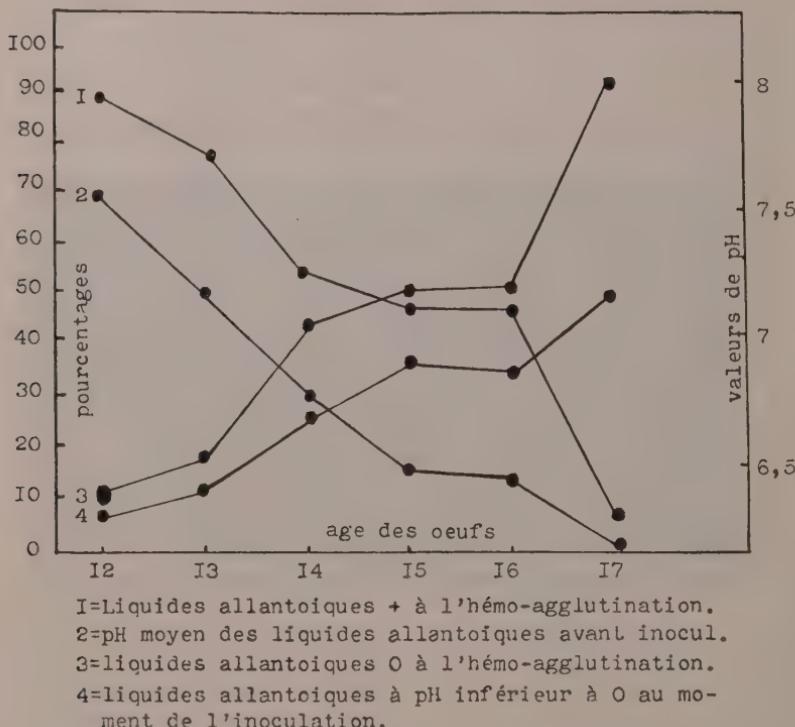


FIG. 3.

liquide allantoïque. Ce pH pouvait ainsi continuer à descendre rapidement au-dessous de 6 dans les quelques heures suivantes, et dans ce cas l'infection ne se produisait pas. Ce qui importe, ce ne serait pas tant le pH du liquide au moment de l'inoculation du virus (et de son adsorption sur les cellules de la membrane chorio-allantoïque qui se fait presque aussitôt), mais plutôt son pH à un stade ultérieur de la multiplication (peut-être fixation du deuxième cycle). Mais nous ne discuterons pas plus de ces phénomènes. Ils ne sont à retenir ici que dans la mesure où ils expliquent la non-réceptivité de certains œufs à pH allantoïque

supérieur à 6. Tout ceci n'est évidemment valable que si l'on emploie une dilution de virus pas trop grande et suffisamment éloignée de la dose infectante limitée. La dilution de 10^{-6} utilisée dans ce travail répond à ces conditions pour la souche de virus considérée.

Un autre facteur pouvant jouer un rôle dans la réceptivité des œufs à l'infection réside en l'augmentation, dans le liquide allantique des œufs normaux à partir du douzième jour, d'un inhibiteur de l'hémo-agglutination produite par le virus grippal. Cette substance, mise en évidence par Svedmyr [15, 16, 17] et étudiée ensuite par Hardy et Horsfall [18] et Polley [12], pourrait inhibier la fixation du virus sur les cellules de la membrane chorio-allantique. S'il est possible de faire intervenir ce facteur pour expliquer la non-réceptivité de certains œufs à pH allantique supérieur à 6, il est hors de doute que, d'après ce que nous venons de voir, l'existence de liquides à pH trop acide joue le principal rôle, car quel que soit l'âge de l'embryon (12 ou 17 jours), un pH allantique à 5,8 au moment de l'inoculation est incompatible avec l'infection. En outre, comme l'ont signalé Henle [19] et Florman [20], la réaction entre les récepteurs des globules rouges et le virus n'est pas un modèle parfait de la réaction entre le virus et les cellules susceptibles d'être infectées.

Les résultats obtenus plus haut répondent à une même série d'expériences. Suivant l'origine des œufs et la manière dont ils sont incubés (température surtout), on pourra avoir des pourcentages différents pour un jour donné, mais les courbes auront toujours le même aspect. Les valeurs ne seront pas les mêmes, mais les courbes seront semblables, et on aura toujours une diminution de la réceptivité à l'infection correspondant à une augmentation du nombre des œufs à pH allantique inférieur à 6. Ceci nous amène à reconsidérer l'importance de la température d'incubation des œufs avant inoculation. Romanoff et Hayward [21] ont montré que plus la température d'incubation est élevée, plus précoce est la chute normale du pH du liquide allantique. Ceci s'explique par le fait que des embryons incubés à 39° se développent plus rapidement qu'à 37° ou 35°. Leur métabolisme est plus actif. Par suite, le pourcentage des œufs à pH allantique inférieur à 6 est plus important, pour un jour donné, parmi les œufs incubés à 39° que parmi ceux incubés à 37° ; et ceci pour des œufs provenant du même élevage, c'est-à-dire ayant la même composition nutritive moyenne. Beveridge en 1944 [22], étudiant l'influence de la température d'incubation préliminaire des œufs sur leur réceptivité à l'infection par les souches de virus grippal Bon et Bel, constata qu'un pourcentage important d'œufs incubés à 39° présentait, quarante-huit heures après inoculation, un liquide négatif à l'hémo-agglutination, alors que tous ceux incubés à 37°

possédaient un liquide positif au même test. L'auteur ne donna pas l'explication de ces différences de réceptivité. Il est très probable que parmi ces œufs incubés à 39°, il y en avait un certain nombre dont le liquide allantoïque présentait un pH trop acide et incompatible avec l'infection, alors qu'à 37° il n'en existait pas encore. Ceci est d'autant plus probable que ce phénomène ne se produisait qu'après inoculation allantoïque, l'injection de virus dans l'amnios ou le sac jaune donnant toujours des résultats positifs. Or on sait [3] que ces milieux ont un pH nettement alcalin et relativement stable.

II. — pH DU LIQUIDE ALLANTOÏQUE, AGE DE L'ŒUF EMBRYONNÉ ET DÉVELOPPEMENT QUANTITATIF DU VIRUS.

Jusqu'à présent, il n'a été considéré que le côté qualitatif de la question. Seule la réceptivité totale ou nulle de l'œuf a été envisagée. Il peut être intéressant de rechercher dans quelle mesure l'abaissement normal du pH du liquide allantoïque et l'augmentation du pourcentage des œufs non réceptifs consécutifs au vieillissement de l'œuf peuvent jouer un rôle dans le développement quantitatif du virus dans le liquide allantoïque.

EXPÉRIMENTATION. — Cinq lots de 20 œufs embryonnés, âgés de 12, 13, 14, 15 et 16 jours, sont inoculés par voie allantoïque avec la souche A PR8 à la dilution de 10^{-6} . Après quarante-huit heures d'une nouvelle incubation à 37°, les œufs sont tous ponctionnés afin de déterminer le nombre de liquides allantoïques infectés dans chaque série, puis mis à refroidir à 4° pendant quinze heures et ensuite prélevés en 5 pools correspondant aux cinq jours considérés. Les œufs morts ou infectés sont éliminés. Le volume et le titre hém-o-agglutinant de chaque pool est déterminé de façon précise. A cet effet, on pratique deux séries de dilutions de 2 en 2 pour chaque pool, l'une commençant au 1/20 et l'autre au 1/32. Le titre hém-o-agglutinant est représenté par l'inverse de la dilution la plus forte donnant encore une agglutination totale. Le titre hém-o-agglutinant moyen par œuf est donné par la formule $\frac{E \cdot F}{B}$ (E = volume total du pool, F = titre hém-o-agglutinant, B = nombre d'œufs dans chaque pool).

RÉSULTATS ET DISCUSSION (tableau II).

Les résultats montrent, comme précédemment, en même temps qu'une diminution du pH moyen avant inoculation, une augmentation du nombre des œufs non infectés. Mais le nombre d'unités hém-o-agglutinantes par œuf ne semble pas inversement propor-

TABLEAU II.

A	B	C	D	E	F	G
I4	I7	7,37	18 %	133 ml	1280	9425
I5	I9	6,74	32 %	94 ml	512	2533
I6	I9	6,52	58 %	85 ml	160	715
I7	I7	6,42	53 %	38 ml	160	357
I8	I9	6,06	70 %	62 ml	40	130

A=age des œufs au moment du prélèvement.

B=nombre d'œufs examinés.

C=pH moyen des liquides allantoïques avant inocul.

D=pourcentages des liquides allantoïques négatifs.

E=volume total de liquide.

F=titre hémо-agglutinant moyen.

G=nombre d'unités hémо-agglutinantes moyennes par œuf : $\frac{E.F}{B}$

tionnel seulement au nombre des œufs négatifs. Cela signifie-t-il que le virus se développe quantitativement moins bien dans des œufs à pH allantoïque compris entre 6 et 7 que dans ceux à pH allantoïque nettement alcalin ? De nombreux examens n'ont pas confirmé cette hypothèse. Le virus peut se multiplier aussi bien dans un liquide allantoïque à pH 6,5 (et aussi rapidement) que dans un liquide à pH 8. Il peut y avoir, d'un œuf à l'autre, des variations individuelles en ce qui concerne la quantité de virus récoltée, mais elles affectent aussi bien les œufs à pH allantoïque à 6,5 qu'à 8. Les quantités moyennes sont les mêmes.

L'explication réside dans l'existence de l'inhibiteur de Svedmyr [45] que contient le liquide allantoïque normal (ou non infecté, ce qui revient au même) et qui inhibe en partie l'hémо-agglutination d'une certaine quantité de virus existant. Polley, Burr et Gillen [42] ont étudié les relations pouvant exister entre le pH du liquide allantoïque et la quantité d'inhibiteur que ce liquide renferme. Ils ont déduit de leurs expériences (tamponnement du liquide allantoïque neuf *in vivo*) que l'augmentation de l'inhibiteur au cours du vieillissement de l'œuf n'était pas liée à la chute du pH du liquide allantoïque. L'expérience ci-après, si elle confirme d'une part les résultats de Polley, permettra de montrer par quel moyen le pH allantoïque peut tout de même jouer un rôle indirect dans la quantité d'inhibiteur existant dans un pool de liquides allantoïques à un jour donné.

Des œufs embryonnés de 14, 15, 16, 17 et 18 jours, incubés à 38,5°, sont ponctionnés et le pH du liquide allantoïque de chacun d'eux est déterminé. Pour chaque âge envisagé, trois pools distincts de liquides allantoïques absolument dépourvus de globules rouges sont préparés de manière à ne réunir ensemble que les liquides de même pH. Sauf pour les dix-septième et dix-huitième jours, où il n'y a plus de liquides alcalins, on aura pour chaque jour trois liquides, l'un à pH 8, l'autre à pH 7 et le dernier à pH 6.

Le titre inhibiteur de chacun des 13 liquides ainsi préparés (et débarrassés par centrifugation de leurs précipités) est déterminé par la même méthode que celle employée par Polley. La souche de virus A-PR8 est diluée semblablement quatorze fois de 2 en 2 sur 10 tubes en eau physiologique. Le premier tube contient 0,05 ml de virus dans 0,5 ml d'eau. Aux 10 tubes de chacune des 13 séries on ajoute 1 goutte de l'un des 13 liquides à examiner. La quatorzième série reçoit 1 goutte d'eau physiologique et sert de témoin. Pour augmenter la précision des résultats, on effectue 14 nouvelles séries de dilutions où la dilution de virus dans le premier tube n'est pas de 1/20, mais de 1/32. Les doses de liquide allantoïque ajoutées sont identiques. L'ensemble des tubes est agité et chacun reçoit pour terminer 0,5 ml d'une suspension d'hématies de poule à 0,25 p. 100. La lecture se fait après deux heures de sédimentation à la température du laboratoire. Le titre inhibiteur de chaque liquide est le rapport entre le titre hémо-agglutinant de la série témoin et le titre de chacune des séries ayant reçu du liquide allantoïque.

TABLEAU III.

Jours	I4			I5			I6			I7			I8		
pH	8	7	6	8	7	6	8	7	6	-	7	6	-	7	6
Unités inhibit.	I6	20	20	20	40	40	80	80	64	-	128	160	-	256	256
Moyennes	I8,7			33,3			74			I44			256		
progression	<u>I</u>			<u>2</u>			<u>4</u>			<u>8</u>			<u>I6</u>		

Les résultats (tableau III) montrent immédiatement que, d'une part, le titre inhibiteur est, à peu de chose près, le même pour un jour donné, quel que soit le pH du liquide allantoïque, et que, d'autre part, ce titre double approximativement de valeur d'un jour à l'autre.

Si l'on reconsideère maintenant les titres hémо-agglutinants obtenus dans les liquides allantoïques des 5 pools correspondant

aux cinq jours envisagés (tableau II), on s'explique pourquoi une grande partie du virus existant réellement dans les pools de ces liquides n'est pas détectée par hémo-agglutination, et ceci d'autant moins que la proportion de liquides non infectés est plus grande, car, comme l'a montré Svedmyr [47], le titre inhibiteur des liquides infectés est négligeable. Prenons comme base le titre hémo-agglutinant au quatorzième jour (jour de prélèvement correspondant aux œufs inoculés à 12 jours) et effectuons les corrections en multipliant les titres des jours suivants, d'une part par 2, 4, 8 et 16 (suppression de l'effet inhibiteur), et, d'autre part, par le rapport entre le pourcentage des œufs négatifs aux différents jours et celui des œufs négatifs à 14 jours. Cette double opération a pour effet de corriger d'abord l'augmentation quotidienne de l'inhibiteur, et ensuite l'accroissement de la quantité d'inhibiteur produit par l'accroissement des œufs non infectés.

TABLEAU IV.

Jours	I4	I5	I6	I7	I8
titre H.A. non corrigé	9425	2533	715	357	130
titre H.A. après correction	9425	8964	9533	8690	8890

calcul de la correction : $X = \frac{I}{i} \cdot \frac{N}{n} \cdot T$

T= titre hémo-agglutinant au jour considéré.
i= rapport du titre inhibiteur le jour considéré
i au titre inhibiteur à I4 jours.*2,4,8,I6.
 N=pourcentage des œufs négatifs le jour considéré
 n=pourcentage des œufs négatifs à I4 jours.

Les résultats exposés dans le tableau IV montrent que les titres hémo-agglutinants deviennent sensiblement équivalents, aux erreurs d'expériences près. Ce qui signifie que, lorsque cela lui est possible, le virus se développe aussi bien dans des œufs embryonnés de 12 jours que dans des œufs de 16 jours, ainsi que l'a signalé von Magnus [23], mais que sa mise en évidence quantitative est impossible d'une manière exacte.

D'après ces constatations, on peut dire que, si le pH du liquide allantoïque ne joue pas un rôle direct dans les phénomènes liés à l'augmentation de l'inhibiteur de l'hémo-agglutination dans les liquides allantoïques d'œufs âgés, il joue un rôle indirect de pre-

mier plan en empêchant par sa valeur trop basse (inférieure à 6), d'une manière de plus en plus importante au cours du vieillissement de l'œuf, tout développement de virus dans certains œufs et, par suite, en augmentant d'autant, dans un lot d'œufs inoculés, la quantité de l'inhibiteur qui est maximum dans les liquides allantoïques non infectés.

RÉSUMÉ.

Au cours du vieillissement d'un lot d'œufs embryonnés, la réceptivité moyenne des œufs à l'infection par le virus grippal par voie allantoïque diminue parallèlement à la baisse moyenne du pH du liquide allantoïque avant inoculation. La cause de ce phénomène réside en l'augmentation quotidienne du nombre des œufs dont le pH du liquide allantoïque, inférieur à 6, ne permet pas le développement du virus.

Lorsque l'infection peut se produire, la valeur du pH du liquide allantoïque n'a pas d'influence sur le développement quantitatif du virus. Si la quantité de l'inhibiteur de l'hémo-agglutination, qui existe dans les liquides allantoïques des œufs embryonnés âgés, n'a pas de relation, dans un lot d'œufs neufs, avec la valeur du pH de ces liquides, elle dépend toutefois indirectement de cette valeur, dans un lot d'œufs infectés, du fait qu'elle est maximum dans les liquides qui n'ont pu être infectés à cause de leur pH trop acide.

Les corrections effectuées sur les titres hémo-agglutinants des liquides allantoïques de lots d'œufs infectés à différents âges embryonnaires, en ce qui concerne d'une part l'augmentation journalière de l'inhibiteur et, d'autre part, l'accroissement des œufs non infectés, semblent indiquer que le virus peut se développer aussi bien dans des œufs âgés de 12 jours que dans des œufs âgés de 13, 14, 15 ou 16 jours.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. AGGAZOTTI. *Arch. Ital. de Biol.*, 1913, **59**, 305.
- [2] F. GUELARD et P. PORTIER. *C. R. Acad. Sci.*, 1925, **180**, 1962.
- [3] J. NEEDHAM. *Chemical Embryology*, 1931, 3 vol. Cambridge University Press.
- [4] K. YAMADA. *Japon. J. Med. Science*, 1933, **142**, 47.
- [5] N. SHELYAR. *Ukrain Biokhem. Rhon.*, 1937, **10**, 379.
- [6] P. A. WALKER. *J. Gen. Physiol.*, 1943, **26**, 495.
- [7] C. A. RANDLES et A. L. ROMANOFF. *J. exp. Zool.*, 1950, **114**, 27.
- [8] S. LAJMANOVICH, N. MITTELMAN, A. S. PARODI, F. G. PENNIMPÈDE. *Rev. Inst. Bact. Malbran*, 1945, **48**, 13, 293.
- [9] U. S. NAVY MED. RES. UNIT n° 1. *J. Gen. Phys.*, 1944-1945, **38**, 585.
- [10] L. W. MC LEAN JR., G. R. COOPER, A. R. TAYLOR, D. et J. W. BEARD. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1945, **59**, 192.

- [11] A. S. PARODI, S. LAJMANOVITCH, F. PENNIMPÈDE, N. MITTELMAN. *J. Immunol.*, 1948, **58**, 109.
- [12] J. R. POLLEY, M. M. BURR, A. L. GILLEN. *Canada. J. Res. E.*, 1950, **28**, 113.
- [13] B. FAUCONNIER. Ces *Annales*, 1953, **85**, 222.
- [14] R. H. GREEN et M. W. FREYMAN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1949, **71**, 476.
- [15] A. SVEDMYR. *Ark. Kani. Min. Geol.*, 1947, **24** B.
- [16] A. SVEDMYR. IV^e Congrès Microb. Copenhague, 1947.
- [17] A. SVEDMYR. *Brit. J. exp. Path.*, 1948, **29**, 295 et **30**, 237.
- [18] P. H. HARDY, F. L. HORSFALL Jr. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 463.
- [19] W. HENLE et G. HENLE. *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 347.
- [20] FLORMAN. *J. Bact.*, 1948, **55**, 183.
- [21] A. L. ROMANOFF et F. W. HAYWARD. *Biol. Bull.*, 1943, **84**, 141.
- [22] W. I. B. BEVERIDGE. *Austr. J. exp. Biol. Med. Science*, 1944, **22**, 169.
- [23] P. VON MAGNUS. *Acta Path. Micr. Scand.*, 1951, **28**, 250).

ÉTUDES DE SYSTÉMATIQUE BACTÉRIENNE

X. RÉVISION DES ESPÈCES RÉUNIES DANS LE GENRE *ACHROMOBACTER*

par J. BRISOU et A.-R. PRÉVOT (*).

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

Les espèces réunies dans le genre *Achromobacter* forment un ensemble beaucoup trop hétérogène qu'il devient indispensable de reviser. Des bactéries ont été inconsidérément étiquetées *Achromobacter*. D'autres ont été placées dans des genres ou des familles différentes (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceæ*, *Moraxella*, etc.) alors qu'elles appartenaient précisément au genre *Achromobacter*. Autrement dit, on a introduit dans ce genre des espèces qui n'en étaient pas, alors que des *Achromobacter* authentiques en ont été exclus.

Bergey, en 1923, proposa le premier le genre *Achromobacter*. Pour cet auteur et ses collaborateurs, ce genre est le second de la famille des *Achromobacteriaceæ*, ordre des Eubacteriales. Le genre I de cette famille est *Alcaligenes*, Castellani et Chalmers, le genre III comprend les *Flavobacterium*. J. Magrou et A.-R. Prévot (1948) situent le genre *Achromobacter* dans la tribu des *Achromobacteræ*, qu'ils classent parmi les *Pseudomonadaceæ*. Cette position est de beaucoup la plus logique [4].

Dans un travail récent [2] l'un de nous a reconstruit le problème et proposé une systématique simplifiée permettant une orientation rapide des quelques espèces rencontrées en clinique ou dans les denrées alimentaires. J. Barreau dans sa thèse [3] a résumé cette conception.

L'essentiel de ce mémoire est d'incorporer les espèces réunies sous le terme générique *Alcaligenes* dans le genre *Achromobacter*, d'exclure de celui-ci les espèces à Gram-positif classées à tort par certains auteurs dans ce genre et enfin d'y regrouper des espèces à Gram-négatif mal classées ou non classées (certaines *Shigella*, quelques *Pseudomonas* non chromogènes, des *Moraxella*, *Neisseria*, etc.).

Nous avons voulu enfin séparer d'une manière plus formelle les espèces mobiles des espèces immobiles. Il a fallu pour cela définir un genre nouveau, celui des *Acinetobacter*, dont on donnera plus loin la raison et le sens.

(*) Manuscrit reçu le 15 mars 1954.

La littérature permet de dénombrer environ 130 espèces décrites au moins une fois sous l'épithète *Achromobacter*. Il va sans dire que bon nombre de ces espèces ne devaient pas lui être rattachées : on ne peut en effet accepter les espèces Gram-positives comme *Achr. amylovorum*. Les espèces gazogènes ne peuvent pas non plus être considérées comme *Achromobacter*. Cela est contraire à la définition que nous en donnerons.

On sait d'autre part que les *Pseudomonas* sont caractérisés par la présence d'un pigment soluble diffusant dans les milieux de culture. Nous avons donc admis dans le genre *Achromobacter* les *Pseudomonadaceæ* incolores considérées à tort comme des *Pseudomonas*. C'est le cas par exemple de *Pseudomonas membraniformis* et de bien d'autres non chromogènes [10] pour lesquelles il n'a pas été tenu compte de cette absence de pigment.

Les *Enterobacteriaceæ* attaquent toujours le glucose et les nitrates ; il était donc contraire aux définitions d'y vouloir inclure le genre *Alcaligenes* dont les espèces n'exercent pas la moindre activité sur les sucres et ne réduisent que rarement les nitrates.

L'un de nous [4] a discuté avec Morichau-Beauchant le cas de *Moraxella lwoffi*. La thèse de Bourlat [5] fut consacrée à ce sujet. Ses conclusions proposaient de placer les germes décrits sous les noms de *B. anitratum*, *Moraxella lwoffi* var. *glucidolytica* [6] dans le groupe des *Achromobacter*. Nous proposons maintenant de les grouper dans le nouveau genre *Acinetobacter*.

Ces prises de position n'ont pas été sans soulever quelques critiques [7] surtout en ce qui concerne le genre *Alcaligenes*. Mais il faut reconnaître qu'aucune raison morphologique, biochimique ou sérologique ne vient à l'appui des thèses proposées.

La conception de Nyberg rapportée par Topley et Wilson en 1946 n'est pas davantage admissible. D'après ces auteurs, on distingue un type immobile, sans action sur le lait et les sucres auquel on réserve l'épithète — du reste incorrecte — de *Bacillus fecalis alcaligenes*. Le second type, mobile, alcalinisant le lait et les solutions glucosées, reçoit le nom de *Vibrio alcaligenes*. (On doit limiter le genre *Vibrio* aux seules espèces incurvées munies d'un cil polaire).

Rien ne peut donc s'opposer à ce que l'on considère les espèces décrites dans le genre *Alcaligenes* comme des *Achromobacter*. Ce sont des bacilles Gram-négatif, mobiles, munis de cils polaires ou pérítriches, faciles à cultiver, donnant sur gélose des colonies incolores.

Nous proposons la suppression d'un genre sur lequel personne n'est d'accord et dont aucun argument sérieux ne permet de défendre l'autonomie.

Enfin, comme nous l'avons annoncé, il paraît utile de séparer les espèces mobiles des espèces immobiles. Pour ces dernières le

nom générique *Acinetobacter*, tiré du grec : *ακινητος*, paraît justifié. Il groupera les anciens *Achromobacter* immobiles. Il en résulte que la première définition de Bergey sera un peu modifiée.

DÉFINITIONS. — CARACTÈRES GÉNÉRAUX.

I. — *Achromobacter*.

Les *Achromobacter* sont des bacilles mobiles, Gram-négatifs, aisés à mettre en évidence par les procédés usuels : la coloration bipolaire est fréquente. Ces bâtonnets mesurent de 0,1 à 0,3 μ sur 1,5 à 4 μ . On rencontre des formes courtes ou au contraire filamenteuses suivant les conditions de milieu. Ces germes doivent leur mobilité à un appareil ciliaire polaire ou périrritricle. Ils n'ont ni spore, ni capsule. On observe des variantes « R » ou « M » comme chez les autres bactéries ; les formes « M » muqueuses ont, bien entendu, perdu leur mobilité.

CULTURE. — Si l'on fait exception des espèces adaptées à la vie maritime, pour lesquelles on doit mettre en œuvre des procédés de culture particuliers, tous les *Achromobacter* sont aisés à cultiver. Tous les procédés conviennent à ces germes qui se comportent aussi bien à la température ordinaire qu'à 37°. L'optimum de croissance se situe souvent entre 25° et 30°. On a pu cultiver certaines espèces à 0° ou à -3° (Coyne, Zobell, etc.). Ces bacilles habitués à la vie libre sont peu exigeants, ils possèdent de grandes facultés d'adaptation qui leur permettent de croître dans des milieux synthétiques extrêmement pauvres, ainsi que J. Barreau le montre dans sa thèse [3].

Sur gélose : colonies épaisses, brillantes, grisâtres ou translucides (espèces marines surtout), butyreuses ou visqueuses, filantes. Les vieilles cultures peuvent prendre une teinte café au lait comme certaines cultures de *Proteus*. Il ne s'agit pas là d'une chromogenèse, mais de simples phénomènes d'oxydation.

Le bouillon est uniformément troublé par la plupart des souches. Certaines y forment un voile superficiel ou constituent des dépôts abondants.

Les *Achromobacter* sont tantôt aérobies stricts, tantôt anaérobies facultatifs. Ils sont dotés d'une activité glucidolytique qui varie suivant les espèces. Leurs cultures ne donnent jamais lieu à un dégagement gazeux. Les autres caractères biochimiques servent de base à leur détermination. Il faut noter enfin que bien des espèces croissent sur les milieux spéciaux destinés à l'isolement des *Enterobacteriaceæ* avec lesquelles on peut les confondre si l'on n'en fait qu'une étude superficielle. R. Buttiaux et coll. [9] ont spécifié l'aspect des colonies d'*Achromobacter* sur le milieu au triphényltétrazolium additionné de tergitol dont ils font usage pour

les analyses d'eaux de boisson. Ces colonies sont violettes en raison de la réduction du TTC. Lorsque les espèces sont lactose-négatives, elles forment des colonies entourées d'un halo bleu.

HABITAT. — Les *Achromobacter* sont très répandus dans la nature. On les rencontre dans le sol, les eaux douces, les eaux de mer, les égouts, les coquillages et autres produits de la mer, la boue, l'intestin de l'homme et des animaux terrestres ou marins, les insectes, etc. Nous en avons isolé de pus, d'urines, de selles humaines. Ces notions soulèvent des problèmes d'hygiène et posent la question de leur rôle possible en pathologie. Il est encore prématûré de répondre. Des enquêtes sont en cours actuellement.

CONSTITUTION ANTIGÉNIQUE. — On sait peu de chose sur la constitution antigénique des *Achromobacter*. On peut cependant avancer qu'il n'y a pas de parenté antigénique entre eux et les *Enterobacteriaceæ*.

L'un de nous a observé une communauté d'antigène entre une souche d'*Achr. litoralis* isolé de l'eau de mer à Toulon et *Achr. iophagum* provenant de l'eau d'un aquarium d'appartement. (*In thèse de Barreau*). Le sérum anti-*iophagum* agglutinait en outre certaines souches d'*anitratum*. Ceci montre déjà une parenté antigénique entre les deux genres *Achromobacter* et *Acinetobacter*.

II. — *Acinetobacter*.

Ce genre nouveau est proposé pour grouper tous les *Achromobacter* immobiles. Il n'est pas rare de rencontrer parmi eux des formes très courtes, parfois même capsulées, que l'on a pu prendre pour des *Neisseriaceæ*. Un certain nombre de « *Mimeæ* » proposées par de Bord, sont comme l'un de nous l'a précisé [4 bis] des espèces très courtes. Ces formes ne sont pas rares en clinique humaine. En les cultivant sur des milieux appauvris en potassium selon la technique de Lwoff et Ionesco [41], on obtient des variantes filamentueuses ou franchement bacillaires [5].

Ces données générales posées, il nous reste à dresser le tableau des espèces actuellement admises dans les deux genres : *Achromobacter* et *Acinetobacter*.

Situons-les tout d'abord dans la taxonomie française :

Ordre : Bacterales.

Famille : *Pseudomonadaceæ*.

Tribu II : *Achromobactereæ*.

Genre I. — *Achromobacter*.

— II. — *Acinetobacter*.

— III. — *Mycoplana*.

Genre I. — *Achromobacter* (Bergey et al.), J. Brisou et A.-R. Prévot *emend.*

Définition. — Bacilles Gram-négatifs, mobiles. Cils polaires ou périthriches. Cultures incolores ; pas d'élaboration de pigment soluble. Lait tournesolé faiblement acidifié, inchangé ou alcalinisé. Rencontrés dans le sol, les eaux, chez l'homme et les animaux terrestres ou marins. Espèce-type : *Achr. liquefaciens* (Eisenberg) Bergey et al.

I. — Nitrates réduits en nitrites :

a) Gélatine liquéfiée.

Indologènes : $H_2S = +$: *Achr. iophagum*.

$H_2S = -$: *Achr. ichthyodermis*, *Achr. minuscula*, *Achr. lipolyticum*.

Ni indol, ni H_2S :

1. — Glucides fermentés : *Achr. delicatulum*, *Achr. grypheæ* et var. *cannensis*, *Achr. echinodermis*, *Achr. putrefaciens*.

2. — Glucides non fermentés : *Achr. thalassius*, *Achr. recti*, *Achr. hyalinus* et variétés : *liquidum* et *denticulatum*.

b) Gélatine non liquéfiée :

1. — Indologènes H_2S : + *Achr. pinnatum* et var. *gemminum*.

2. — Ni indol, ni H_2S :

1. — Glucidolytiques : *Achr. aquamarinus*, *Achr. azotogena*, *Achr. rathonis* et var. *desmolyticum*, *Achr. perfectomarinus*.

2. — Non glucidolytiques : *Achr. sewerini* et var. *stutzerii*, *Achr. cycloclastes*, *Achr. agile*, *Achr. centropunctatum* et var. *reticulare*.

II. — Nitrates non réduits en nitrites :

a) Gélatine liquéfiée :

1. — Indologènes H_2S + ou — : *Achr. fairmountense*, *Achr. septicemiae*, *Achr. coadunatum*.

2. — Non indologènes H_2S + : *Achr. liquefaciens*, *Achr. marinoglutinosa*, *Achr. periphyta*.

3. — Ni indol, ni H_2S :

1. — Glucidolytiques : *Achr. litoralis*, *Achr. marinoglutinosa*, *Achr. membranula*.

2. — Non glucidolytiques : *Achr. formosum* et variétés : *bookeri*, *multistriatum*, *nitrificans*, *nebulosum*, *geniculatum*, *stoloniferum* et *superficiale*.

4. — Espèces luminescentes : *Achr. fischeri*, *Achr. phosphoreum*.

b) *Gélatine non liquéfiée* :

1. — Indogènes H_2S variable : *Achr. pikowsky* et variétés *ambigua* et *sinosum*.
2. — Non indogènes H_2S + : *Achr. fecaloides*, *Achr. guttatum* (glucidolytiques) ; *Achr. mariense* (non glucidolytique).
3. — Ni indol, ni H_2S :
Glucidolytiques : *Achr. arvillum* et var. *salopium*.
Non glucidolytiques. Lait alcalinisé : *Achr. alcaligenes* et variétés : *alcaliaromatum*, *revenelii*, *rugosum*, *soltarium*, *pellucidum*. Lait inchangé : *Achr. innunctum*, *Achr. venenosum*, *Achr. hartlebi*.
4. — Espèces luminescentes : *Achr. phosphoricum*.

Genre II. — *Acinetobacter* J. Brisou et A.-R. Prévot 1954.

Définition : *Pseudomonadaceæ* incolores, immobiles, parfois capsulées. Les formes très courtes, cocoïdes, sont fréquentes. Culture facile sur tous les milieux usuels. Certaines espèces sont souvent rencontrées en clinique humaine dans les pus d'uréthrites, de sinusites, les urines. Autres caractères identiques aux *Achromobacter*.

I. — *Nitrites réduits en nitrites* :a) *Gélatine liquéfiée* :

1. — Glucidolytiques : *Acin. stationis*.
2. — Non glucidolytiques : *Acin. stenohalis*.

b) *Gélatine non liquéfiée* :

- Acin. spermophilum*, *Acin. equirulis*, *Acin. delmarvæ* et var. *gintottensis*, *minutissima*, *ubiquitum*, *nitrovorum*, *fermentationis*, *filefaciens*, *Acin. nasalis*.

II. — *Nitrates non réduits en nitrites* :a) *Gélatine liquéfiée* :

- Glucidolytique : *Acin. butyri*.
- Non glucidolytique : *Acin. marshalli*.

b) *Gélatine non liquéfiée* :

1. — Indogènes H_2S + ; *Acin. larveæ* et var. *tangelensis*.

2. — Pas d'indol, H_2S + : *Acin. douglasii*, *Acin. eurydice*.

3. — Ni indol, ni H_2S :

- Glucidolytiques : *Acin. anitratum*, *Acin. winogradskyi*, *Acin. cocoideum* et var. *oxygenes*, *lacticum*, *acidum* et *middletowni*.

- Non glucidolytiques : *Acin. lwoffii* (var. *brevis* et

bacteroides), *Acin. viscosum*, *Acin. metalcaligenes* et var. *jiogense*, *rodonatum*, *refractum*, *candidans*, connii.

Tel est donc le tableau actuel. Il réduit les quelque 130 espèces décrites dans la littérature à 51 espèces et variétés. La taxonomie que nous présentons donne place à des bactéries telles que *B. anitratum*, *Morarella lwoffi* glucidolytiques et non glucidolytiques, *Neisseria winogradskyi*, qui toutes furent, depuis quelques années, l'objet de nombreuses discussions.

Enfin il semble aussi que la solution adoptée pour le genre *Alcaligenes* et ses variétés soit raisonnable. L'espèce type de Petruschky et les variétés décrites depuis trouvent toutes une place dans notre systématique. Certaines d'entre elles étaient du reste rigoureusement identiques à des bactéries décrites ailleurs comme des *Achromobacter*.

BIBLIOGRAPHIE

- Ouvrages généraux : *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. Editions 1923, 1925, 1930, 1938 et 1948.
- A. BESSON. *Technique bactériologique et sérothérapie*. Paris, 1934.
- J. DUMAS. *Traité de Bactériologie*. Paris, 1952.
- HAUDUROY, EHRINGER, GUILLOT, MAGROU, PRÉVOT, ROSSET et URBAIN. *Dictionnaire des Bactéries pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes*. Paris, 1953, 2^e édit., Masson.
- TOPLEY et WILSON. *Textbook of Bacteriology and Immunity*, 1946.
- [1] J. MAGROU et A.-R. PRÉVOT. Ces Annales, 1948, **75**, 99.
 - [2] J. BRISOU. Ces Annales, 1953, **84**, 812.
 - [3] J. BARREAU. *Thèse Méd.*, Bordeaux, 1953.
 - [4] J. BRISOU et R. MORICHAU-BEAUCHANT. Ces Annales, 1953, **82**, 640.
 - [4 bis] J. BRISOU, R. MORICHAU-BEAUCHANT et J. GIMENEZ. Ces Annales, 1953, **84**, 814.
 - [5] R. BOURLAT. *Thès. Méd.* Bordeaux, 1953.
 - [6] P. et M. PIÉCHAUD et L. SECOND. Ces Annales, 1951, **80**, 97.
 - [7] H. FLOCH. Ces Annales, 1953, **85**, 5.
 - [8] M. LEMOIGNE, H. GIRARD et G. JACOBELLI. Ces Annales, 1952, **82**, 389.
 - [9] R. BUTTIAUX, G. MUCHEMBLE et TH. LEURS. Ces Annales, 1953, **84**, 1010.
 - [10] C.-E. ZOBELL et UPHAM. *A list of marine Bacteria*, Bull. Ser. Inst. Univ. California. Los Angeles, 1944.
 - [11] A. LWOFF et H. IONESCO. Ces Annales, 1950, **79**, 14.

ÉVALUATION DE « L'EFFICACITE » D'UNE RACE DE PHAGES SUR UNE SOUCHE DE BACTÉRIES

par R. WAHL.

[avec la collaboration technique de G. MARTIN-MONCEAUX] (*)

(Institut Pasteur.)

Nous avons vu dans une publication précédente [4] que les phages peuvent exercer sur une culture bactérienne une action lytique initiale et des actions échelonnées pendant toute la croissance de la culture secondaire. L'ensemble de ces actions constitue l'*effet inhibiteur du phage* sur la culture. Son intensité est fonction, entre autres, d'un facteur particulier à la race de phages considérée, son « *efficacité* » sur la souche correspondante. Pour évaluer cette efficacité, on doit déterminer la loi des variations de l'effet inhibiteur de ce phage sur cette souche en fonction des concentrations des phages et des bactéries.

Par conséquent, une « épreuve d'efficacité » complète devrait théoriquement comporter, comme nous l'avons dit, l'étude de l'effet inhibiteur du phage à toutes les concentrations possibles sur des populations de bactéries de toutes les concentrations possibles également ; ou, tout au moins, l'étude de très nombreux systèmes comportant des concentrations variées de phages et de bactéries. On pourrait par exemple imaginer de nombreuses cultures réparties en de nombreuses séries ; toutes les cultures de la même série contiendraient la même concentration de phages et chacune d'elles une concentration de bactéries différente. La concentration de phages serait différente pour chaque série. Une telle épreuve est évidemment irréalisable.

Mais en fait, l'épreuve peut se réduire le plus souvent à une seule série comportant un petit nombre de populations bactériennes, chacune de concentration différente, et toutes des phages « en excès », c'est-à-dire à la concentration minima suffisante pour lyser en un temps toutes les bactéries réceptives ou à toute autre concentration plus grande. Dans quelques cas (que nous préciserons plus loin), on adjoindra à cette série une ou plusieurs autres, où la concentration des phages sera moindre.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 février 1954.

Cette simplification de l'épreuve est justifiée par les faits suivants :
a) L'effet inhibiteur d'une race de phage sur une population donnée est la même pour toutes les concentrations où les phages sont « en excès ». Il suffit donc, dans l'épreuve d'efficacité, de faire une seule série avec les phages en excès pour obtenir l'effet maximum possible sur la population.

b) Pour les concentrations inférieures à la concentration minima produisant la lyse en un temps, les effets sont en raison inverse de la concentration du phage. C'est donc seulement quand l'effet inhibiteur des phages en excès est très élevé (1) qu'il est utile d'ajouter des séries où les phages sont à ces concentrations inférieures.

I. — EPREUVE D'EFFICACITÉ.

L'épreuve sera faite dans des conditions standard de milieu, de pH, de température, d'oxygénéation, etc. Il est évident que ces conditions ne peuvent pas être identiques pour toutes les espèces bactériennes et l'on choisira pour chacune les plus favorables. Mais il est essentiel qu'elles soient ensuite fixées une fois pour toutes et utilisées dans tous les laboratoires qui voudront évaluer l'efficacité de phages quelconques sur des souches appartenant à cette espèce.

L'épreuve, comme nous l'avons dit plus haut, comportera toujours une série de cultures contenant toutes un excès de phages et chacune une quantité différente de bactéries. Dans quelques cas seulement, cette série sera complétée par une ou plusieurs autres comportant chacune une quantité de phages qui sera une fraction déterminée de celle de la série précédente.

Dans la série de cultures faites en présence d'un excès de phages, la concentration des phages est choisie en vertu des considérations suivantes : la plus forte concentration de phages que l'on puisse réaliser dans une culture est en général $10^9/\text{cm}^3$. En effet les lysats que l'on peut préparer contiennent rarement plus de 10^{10} ph/cm³, et pour éviter l'interférence de l'action de lysines ou de facteurs antagonistes avec celle des phages, les lysats doivent être dilués au moins au 1/10 dans le milieu (c'est-à-dire utilisés au plus à la dose de 1 cm³ pour un volume total de 10 cm³). Il en est de même quand l'épreuve d'efficacité est faite avec un mélange de plusieurs phages.

Les phages à la concentration de $10^9/\text{cm}^3$ ne peuvent lyser en un temps toutes les bactéries réceptives d'une population que si celle-ci ne contient pas plus de 2×10^8 bact/cm³ (cinq fois moins). Le dernier tube de la série contiendra donc 10^9 ph/cm³ et 2×10^8 bact/cm³. D'ailleurs l'effet inhibiteur des phages sur des populations plus nombreuses est toujours trop faible pour qu'il soit intéressant de l'étudier.

Mais le rapport $\frac{\text{phages}}{\text{bact}}$ nécessaire pour obtenir l'infection en un temps de toutes les bactéries réceptives doit être d'autant plus élevé que la concentration de bactéries est plus petite. En fait, en utili-

(1) Nous préciserons plus loin ce qu'il faut entendre par là.

sant la même concentration de 10^9 phages/cm³ dans tous les tubes, on se trouve partout dans les conditions de l'infection en un temps.

Ante ayant choisi la concentration de bactéries pour le dernier tube de la série, il reste à choisir celle des autres. Or, l'expérience montre d'une part qu'il suffit que la concentration réalisée dans chaque tube soit dix fois supérieure à celle du tube précédent pour que l'efficacité du phage soit déterminée avec une précision suffisante et, d'autre part, qu'il est sans intérêt d'utiliser des concentrations inférieures à 2×10^2 bact./cm³.

La série des cultures sera donc disposée de la façon suivante :

Sept tubes de 170×17 mm, identiques, numérotés de 1 à 7, contenant sous un volume total de 10 cm^3 10^9 ph./cm³, et des quantités de bactéries s'échelonnant de 2×10^2 à 2×10^8 bact./cm³ suivant une progression géométrique de raison 10. Chaque tube est accompagné d'un témoin sans phage contenant le même nombre de bactéries que lui. Un autre témoin est constitué par un tube de milieu contenant la même quantité de phages et pas de bactéries. On suit par opacimétrie l'évolution des cultures contenant des phages, les comparant au témoin correspondant. On note les diverses manifestations de l'effet inhibiteur des phages et leur degré (pendant plusieurs jours).

Cette série suffit généralement, comme nous l'avons dit. C'est seulement si les six premiers tubes sont stérilisés (le septième et dernier l'est exceptionnellement) qu'il faudra établir une seconde série. Si, dans celle-ci les six premiers tubes sont encore stérilisés, on fera une troisième série et ainsi de suite.

Dans toutes les séries les tubes contiendront les mêmes quantités respectives de bactéries, mais ceux de la seconde série contiendront dix fois moins de phages que ceux de la première, ceux de la seconde cent fois moins, et ainsi de suite, les concentrations de phages s'échelonnant d'une série à l'autre suivant une progression géométrique de raison 10^{-1} .

En tout cas, on connaît ainsi, dans des conditions standard, l'effet inhibiteur sur les populations représentatives de la souche, d'un excès de phages et, si nécessaire, d'autres concentrations de phages convenablement choisies.

Cet effet se manifeste suivant les cas et suivant la concentration des bactéries par une stérilisation dans certains tubes et par des lyses, par des retards, des ralentissements et des limitations de la croissance dans d'autres tubes. Suivant la nature et le degré des phénomènes observés dans chaque tube, on évalue l'intensité de l'effet inhibiteur correspondant, puis on les compare entre eux, en tenant compte des concentrations respectives des phages et des bactéries.

On évalue ainsi :

Le pouvoir stérilisant du phage vis-à-vis de la souche, pouvoir qui est proportionnel à la plus grande concentration de bactéries stérilisables par lui, et inversement proportionnel à la plus petite concentration de phages nécessaire pour la stériliser.

Ses pouvoirs retardant, ralentissant et limitant, qui ressortent

des actions du phage sur les populations non stérilisées. Ils sont d'autant plus grands que les actions correspondantes se manifestent plus fortement sur des populations plus nombreuses avec des concentrations de phage plus petites.

C'est ainsi que, par exemple, on pourra définir le pouvoir retardant d'un phage en disant qu'il retarde respectivement de quatre jours, de deux jours et de vingt-quatre heures la croissance de 10^4 , 10^5 et 10^6 bact./cm³. Ceci sous-entend que, dans l'épreuve le phage stérilise les populations de moins de 10^4 bact./cm³ et ne retarde pas la croissance des populations de plus de 10^6 bact./cm³.

Des difficultés d'interprétation se présentent cependant dans certains cas, où existe une discordance entre les actions du phage dans des tubes voisins d'une même série. Par exemple on observe une stérilisation dans un tube et non dans le tube précédent ; ou bien l'importance du retard initial, du ralentissement et de la limitation de la croissance ne sont pas exactement en raison inverse de la concentration des bactéries. Il est probable que, dans ces cas, la proportion des bactéries réfractaires dans les populations est différente à cause d'inégalités dues au hasard dans la distribution.

Une discordance peut exister également entre les diverses actions d'un phage sur une même population. par exemple on observe parfois une forte limitation de la croissance sans retard initial ou inversement. Il semble, d'ailleurs, que l'intensité de l'effet inhibiteur soit mieux indiquée par la limitation de la croissance que par le retard initial.

Causes d'erreurs. — Elles sont de deux sortes :

1° Il y a toujours des différences dues au hasard dans le nombre des bactéries réparties et la proportion des bactéries réfractaires. Ces minimes différences, inévitables bien qu'inapparentes, ont une répercussion amplifiée sur la forme des courbes de croissance, de sorte qu'on ne peut jamais reproduire deux fois exactement la même courbe. Mais comme une évaluation d'efficacité nécessite de tracer plusieurs courbes de croissance, elles se contrôlent mutuellement, ce qui dispense de répéter plusieurs fois la même épreuve.

2° Les lysats peuvent contenir des facteurs bactériolytiques ou bactériostatiques [6] et des facteurs antagonistes des phages. Mais leur concentration est trop faible, en général, pour que leur action se manifeste quand le lysat est dilué au 1/10 comme dans l'épreuve d'efficacité. A vrai dire, une nouvelle quantité de ces facteurs est mise en liberté par des bactéries lysées au cours de l'épreuve, mais généralement cette quantité est négligeable ; sauf peut-être quelques exceptions sur lesquelles nous reviendrons dans un prochain travail.

II. — DEGRÉ D’EFFICACITÉ.

On peut classer les résultats de l’épreuve suivant les degrés que nous allons énumérer. Mais il faut dire tout de suite que les deux degrés les plus élevés n’ont été obtenus jusqu’ici qu’avec des mélanges de plusieurs phages.

1^o *Efficacité nulle ou très faible.* — La croissance est en apparence normale quels que soient les nombres de phages et de bacté-

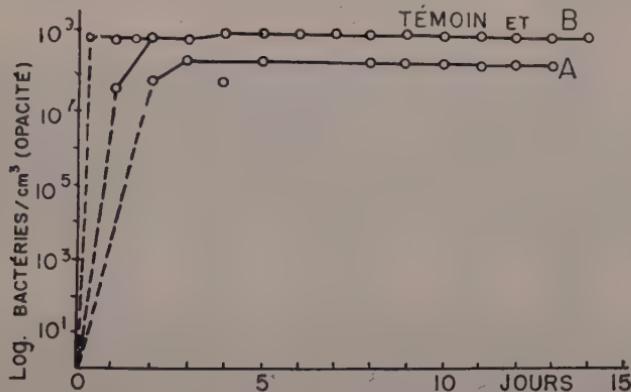


FIG. 1. — Épreuve d’efficacité avec le phage D₄/2 sur *Sal. enteritidis* var. Danysz.

Efficacité très faible. Aucune stérilisation. La courbe A est commune aux cinq premiers tubes, elle montre un retard apparent de deux jours et une limitation modérée de la croissance. La courbe B correspond au sixième tube et montre un retard de vingt-quatre heures mais pas de limitation de la croissance, la courbe venant se confondre au deuxième jour avec celle du témoin sans phages.

Nota. — Les concentrations des bactéries sont évaluées d’après l’opacité. Aussi la lyse primaire, la période stationnaire et le début de la croissance secondaire ne s’inscrivent pas sur les courbes. Elles se font pendant la période correspondant à la ligne pointillée.

ries. En réalité, le phage lyse quelques bactéries, mais trop peu pour que la courbe de croissance soit modifiée. Parfois le phage accélère la croissance, et cette accélération l’emporte sur la lyse : la croissance est alors plus rapide que celle du témoin (2).

2^o *Efficacité faible.* — Dans la série comportant un excès de phages, on constate un retard de quelques heures dans la croissance des populations les moins nombreuses, retard suivi inconstamment d’un léger ralentissement de cette croissance. Il n’y a aucune stérilisation. (fig. 1.)

(2) Nous rappelons que nous n’envisageons dans ce travail que des phages donnant sur la souche un nombre très grand de plages.

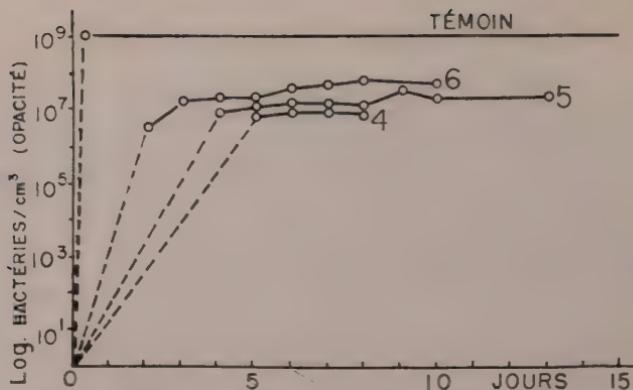


FIG. 2. — Épreuve d'efficacité avec un mélange de sept phages sur la souche 294 de *Sal. typhi murium*. Les numéros des courbes correspondent à ceux des tubes de l'épreuve.

Efficacité moyenne. Stérilisation dans les trois premiers tubes dans lesquels aucune opacité n'est apparue. Dans les tubes 4, 5 et 6, retard apparent et limitation de la croissance, dont la grandeur est inverse de celle de la concentration de bactéries.

Voir *Nota figure 1*.

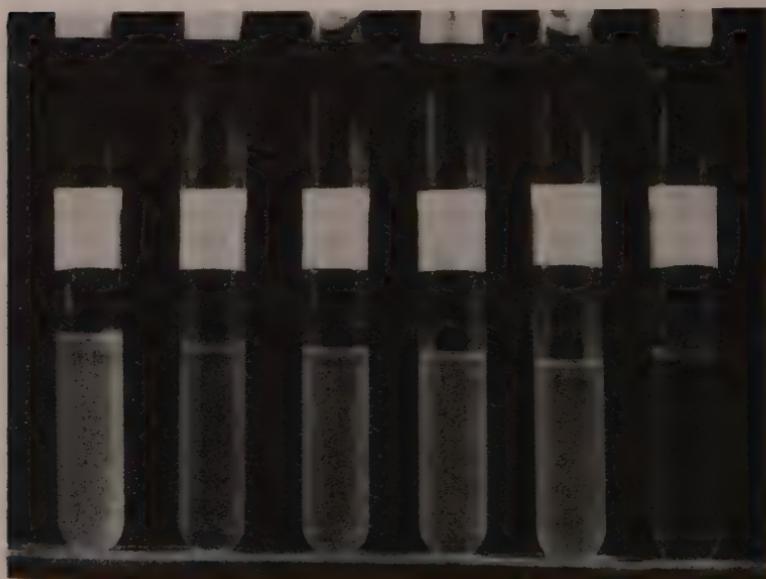


FIG. 3. — Épreuve d'efficacité avec le phage D₄/2 sur la souche 2 de *Sal. enteritidis* var Danysz, septième jour de l'épreuve. De droite à gauche les cinq premiers tubes contiennent un excès de phages et des concentrations croissantes de bactéries de 2×10^2 bact./cm³ à 2×10^6 bact./cm³. Le sixième tube ne contient pas de phages et contient 2×10^6 bact./cm³.

Efficacité faible. Stérilisation dans les premiers tubes. Limitation modérée de la croissance dans les quatre tubes suivants (le cinquième tube est en réalité plus opaque qu'il ne paraît sur le cliché).

3° Efficacité moyenne. — Dans la série avec un excès de phages, il y a stérilisation dans le premier tube (fig. 3), parfois dans les deux ou trois premiers (fig. 2 et 4). Dans les autres tubes, on observe un retard, un ralentissement et une limitation de croissance d'autant moins marqués que la population bactérienne est plus nombreuse (retard de vingt-quatre heures au moins cependant). Dans les autres séries, les actions sont plus faibles et il n'y a pas de stérilisation.

4° Efficacité forte. — Dans la série avec un excès de phages

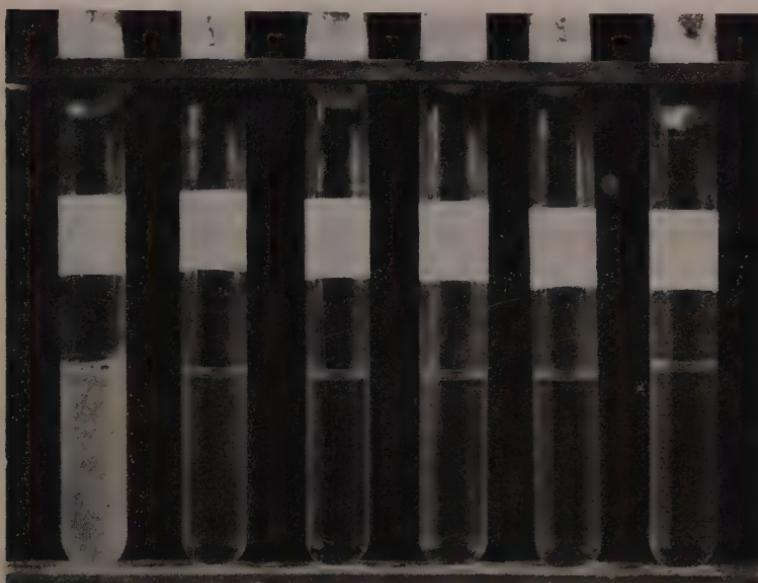


FIG. 4. — Épreuve d'efficacité avec un mélange de sept phages sur la souche 294 de *Sal. typhi murium*. Correspond aux courbes de la figure 2. Neuvième jour de l'épreuve. Même disposition que pour la figure 3.

Efficacité moyenne. Stérilisation dans les quatre premiers tubes (en commençant par la droite). Limitation forte de la croissance dans le cinquième tube (comparer au témoin sans phages).

il y a stérilisation rarement dans tous les tubes, généralement dans tous à l'exception du premier. Dans les autres séries, des retards, des ralentissements et des limitations de la croissance, mais aucune stérilisation.

5° Efficacité très forte. — Dans la série avec un excès de phages : comme dans le cas précédent. Mais il y a de nombreuses stérilisations dans les séries suivantes, parfois jusqu'à la troisième ou la quatrième (où il y a 10^5 ph/cm³).

III. — RÉSULTATS DE L'ÉPREUVE D'EFFICACITÉ SELON LA RACE
DES PHAGES ET SELON QU'ON UTILISE UNE SEULE RACE DE PHAGES
OU UN MÉLANGE.

Nous envisagerons surtout comme exemple les phages agissant sur *Sul. enteritidis* et *Sal. typhi murium* (ceci en vue d'applications *in vivo*, qui feront l'objet d'un prochain travail).

1^o *Efficacité d'un phage employé à l'état pur.* — L'efficacité d'un phage sur une souche dépend à la fois de la race du phage et de la souche sur laquelle il a été propagé antérieurement (en dehors des cas où les phages « adaptés » sont en réalité des mutants, c'est-à-dire une nouvelle race).

Nous avons évalué sur notre souche 2 de *Sal. enteritidis* var. Danysz l'efficacité des phages D₄, D_{5A}, D₅ et T₅ (3), après propagation sur trois souches différentes ; souches 0, 1 et 2 et celle de D₁₀ propagé sur la souche 2. (Nous désignerons chaque phage par son numéro, séparé par une barre de celui de la souche de propagation.)

1^o *Après propagation sur la souche 2,* l'efficacité de D₅/2 sur cette souche non seulement était nulle, mais ce phage accélérerait la croissance ; celles de D_{5A}/2 et de D₄/2 étaient faibles (stérilisation de 200 bact/cm³) ; celles de T₅/2 et D₁₀/2 étaient moyennes (stérilisation de 2 × 10⁴ bact/cm³).

Nous n'avons jamais rencontré de phages ayant à lui seul sur ces Salmonelles une efficacité forte ou très forte. Par contre certains phages de staphylocoques paraissent avoir une forte efficacité, mais ce n'est probablement qu'une apparence due à un facteur lytique associé au phage. Nous y reviendrons dans un prochain travail.

2^o L'efficacité sur la souche 2 des mêmes phages, *après propagation sur une autre souche* était dans certains cas inférieure à ce qu'elle était après propagation sur la souche 2, dans d'autres cas, elle avait gardé la même valeur. C'est ainsi que D₄/1, D₅/1 et T₅/1 étaient respectivement moins efficaces sur la souche 2 que D₄/2, D_{5A}/2, T₅/2 ; mais que T₅/0 avait la même efficacité que T₅/2 ; naturellement D₅/1 avait comme D₅/2 une efficacité nulle.

Pour obtenir l'efficacité maxima d'un phage vis-à-vis d'une souche, il est donc souvent, mais non toujours, nécessaire de le propager sur cette souche.

3^o Les rapports entre les efficacités de différents phages propagés sur la même souche changent avec la souche de propagation.

Ainsi T₅/2 était plus efficace sur la souche 2 que D₄/2 et que

(3) Ces phages ont été décrits dans un travail de Terrade. [4].

$D_{5A}/1$; mais les trois phages, après propagation sur la souche 1 avaient la même efficacité.

2° *Efficacité des mélanges de phages.* — Il y a plusieurs possibilités :

a) L'efficacité du mélange peut être inférieure ou égale à celle du phage le moins efficace. En particulier certains « mauvais phages », comme $D_5/1$, qui accélèrent la croissance, diminuent l'efficacité d'autres phages tels que $D_4/1$ et $T_5/1$. Parfois même le mélange de deux phages, ayant chacun une certaine efficacité, a une efficacité nulle. C'est le cas du mélange de $D_4/2$ et de $D_{5A}/2$.

b) Elle peut être intermédiaire entre celle du phage le plus efficace et celle du phage le moins efficace. Ceci peut s'observer quand un « mauvais phage » est ajouté à un mélange efficace de plusieurs phages.

c) Elle peut être supérieure à celle du phage le plus efficace. — Ainsi, même un phage d'efficacité très faible ou nulle peut renforcer considérablement un phage d'efficacité faible ou moyenne. Un mélange de plusieurs phages d'efficacité très faible peut aussi être très efficace. Par exemple, c'était le cas d'un mélange de sept phages chacun peu efficace sur la souche 294 de *Sal. typhi murium*. Notons que la suppression d'un quelconque de ces phages faisait baisser considérablement l'efficacité du mélange.

On doit retenir surtout qu'il faut mélanger plusieurs phages pour obtenir une efficacité forte ou très forte, que dans les mélanges, il est préférable, mais non indispensable d'employer des phages ayant une assez forte efficacité et enfin qu'il faut éviter les « mauvais phages » qui accélèrent la croissance. Par ailleurs il faut que le nombre de mutants réfractaires à la fois à tous les phages du mélange soit le plus petit possible. Pour cela il est plus important que ces phages soient très différents les uns des autres qu'individuellement très efficaces. Enfin dans un mélange, comme dans un phage de race pure, il faut que la concentration totale en phages soit très élevée (du même ordre que pour un phage employé seul). Pour cela, il suffit que certains phages, (parfois même un seul) aient un titre élevé, il n'est pas indispensable que ce soient tous les phages du mélange ; et certains phages malgré un titre faible, apportent leur contribution importante à l'efficacité du mélange. Cependant, il semble que pour cela la concentration d'un phage doit être au minimum de $10^5/cm^3$.

DISCUSSION.

1° L'effet inhibiteur des phages sur les cultures en milieu liquide a servi de base à notre étude sur l'efficacité. C'est que le titre du phage et les caractères de la lyse sur gélose ne rendent pas compte de l'efficacité d'un phage. Il est vrai que les lysats

des phages efficaces sur une souche atteignent un titre élevé sur celle-ci, mais la réciproque n'est pas vraie, comme nous l'avons vu.

De même le nombre des colonies secondaires visibles après la lyse sur gélose d'un nombre connu de bactéries de la souche, contrairement à ce qu'on pourrait penser, n'est pas égal à celui des bactéries réfractaires. En effet, d'une part certains mutants résistants peuvent être lysés sur place par l'association au phage d'un facteur bactériostatique, produit en plus forte concentration sur gélose qu'en milieu liquide [6] ; et d'autre part, parmi les mutants semi-résistants, certains donnent une colonie, d'autres non, sans que cela renseigne sur l'importance du pouvoir inhibiteur du phage sur la descendance de ces mutants.

2° Le degré d'efficacité d'une race de phage sur une souche est indiqué par les effets inhibiteurs de diverses concentrations de phages sur diverses concentrations de bactéries de la souche. Il dépend du nombre de rencontres efficaces possibles entre les bactéries de la souche et les phages.

Si aucune rencontre efficace n'est possible, l'effet du phage est nul avec n'importe quelles quantités de phages et de bactéries. C'est le cas des souches bactériennes résistantes, qui sont en dehors de notre sujet. Au cas où toutes les rencontres seraient efficaces, la stérilisation de n'importe quelle quantité de bactéries serait produite par n'importe quelle quantité de phages. Mais c'est là un cas limite, jamais observé. Les cas observés se placent entre ces deux extrêmes. Dans le cas le plus général l'efficacité d'une race de phage quelconque sur une souche quelconque dépend, toutes choses égales d'ailleurs, à la fois de la proportion des phages actifs de cette race vis-à-vis de la souche et de celle des bactéries de cette souche réceptives au phage.

La proportion de phages actifs vis-à-vis de la souche, à chaque instant de la croissance de la culture, est probablement fonction de nombreux facteurs dont quelques-uns seulement sont connus. Citons : la durée de la « vie » des phages, parfois très courte (cas des phages actifs seulement à l'état naissant) ; les mutations de phages vers l'activité vis-à-vis des bactéries résistantes de la souche.

La proportion, dans la souche, des bactéries réceptives au phage, conditionne sa « réactivité » actuelle et potentielle (4).

(4) Nous avons montré, dans des publications précédentes, que la réactivité totale d'une souche est fonction de certains caractères génotypiques et phénotypiques [3], que sa réactivité actuelle est fonction du taux des bactéries réceptives dans cette souche, et que sa réactivité potentielle est fonction du nombre des mutants réfractaires et de celui des bactéries réceptives qui apparaissent dans la descendance de ceux-ci [2].

Mais l'épreuve d'efficacité, telle que nous l'avons décrite, n'est utilisable qu'avec une préparation de phages ayant *un titre élevé sur la souche*; ce qui exclut d'une part les cas où les phages sont actifs à l'état naissant, et d'autre part ceux où la réactivité de la souche est faible (en particulier le cas de la plupart des souches semi-résistantes). En effet, dans les cas que nous venons de citer, le titre du phage sur la souche est toujours faible.

L'efficacité d'un phage évaluée dans les conditions de l'épreuve décrite dans le présent travail est donc fonction seulement, d'une part de la possibilité pour ce phage de donner des mutants actifs sur les bactéries réfractaires ; d'autre part de la réactivité de la souche.

Mais ces mutations du phage sont rares et leur rôle est accessoire ; et finalement, l'efficacité d'un phage de titre élevé, celle qu'on évalue dans cette épreuve, dépend essentiellement de la réactivité de la souche vis-à-vis de lui. C'est pourquoi l'épreuve est disposée comme celle des « lyses en série », que nous avons proposée pour évaluer la réactivité d'une souche vis-à-vis d'un phage [2].

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1° L'efficacité d'un phage sur une souche est, parmi les facteurs qui conditionnent son effet inhibiteur sur des cultures de la souche, celui qui est propre à la race du phage. Nous avons indiqué dans un précédent travail comment on peut évaluer cet effet inhibiteur. Nous avons décrit plus haut une épreuve permettant d'évaluer cette efficacité d'un phage et qui consiste à évaluer son effet inhibiteur à des concentrations diverses convenablement choisies sur des populations de la souche de concentrations également appropriées.

2° Cette épreuve permet d'évaluer comparativement l'efficacité de différents phages sur une souche.

3° L'efficacité d'un phage à l'état pur dépend de sa race et de la souche sur laquelle il a été propagé.

4° L'efficacité des mélanges de phages peut être inférieure ou supérieure à celle des différents phages du mélange. Mais il faut souligner que les fortes efficacités ne sont réalisables qu'avec des mélanges de phages.

5° Les caractères de la lyse sur gélose, en particulier le nombre des colonies « réfractaires » qui se développent après la lyse, ne rendent pas compte de l'efficacité d'un phage. Celle-ci est fonction en principe de la proportion des phages actifs et de celle des bactéries réceptives de la souche à chaque instant, mais, dans les conditions de l'épreuve décrite, elle dépend presque uniquement de la « réceptivité » de la souche.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. TERRADE. *Thèse Pharmacie*, Bordeaux, 1950.
- [2] R. WAHL. Ces *Annales*, 1952, **83**, 653.
- [3] R. WAHL. Ces *Annales*, 1953, **84**, 51.
- [4] R. WAHL. Ces *Annales*, 1954, **86**, 589.
- [5] R. WAHL et L. BLUM-EMERIQUE. Ces *Annales*, 1952, **82**, 266.
- [6] R. WAHL et J. JOSSE-GOICHOT. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 1225 et 1703.

**UTILISATION DES HÉMAGGLUTININES
POUR L'IDENTIFICATION DE L'ORIGINE SPÉCIFIQUE
DES HEMATIES INGÉRÉES
PAR LES MOUSTIQUES HÉMATOPHAGES**

par A. GRJEBINE, A. EYQUEM et J. FINE (*).

*(Recherche scientifique d'Outre-Mer
et Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins.
Service du Dr R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE. Institut Pasteur.)*

L'identification du sang ingéré par les insectes est d'un grand intérêt pour l'épidémiologiste en lui permettant d'établir le caractère anthropophile ou zoophile de l'insecte examiné, et de déterminer l'existence d'un écran animal protecteur pour l'homme. Cette identification a été réalisée jusqu'à maintenant à l'aide de la réaction de précipitation ; mais on sait que celle-ci a une sensibilité bien moindre que la réaction d'hémagglutination. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser cette dernière réaction et tenté de préciser les limites de sa sensibilité.

Rappelons en quelques mots comment se pose pour l'épidémiologiste le problème de l'identification du sang ingéré par les moustiques. Les femelles des moustiques hématophages ne piquent pas n'importe quel animal. Elles possèdent des préférences trophiques et piquent un ou plusieurs hôtes à leur portée en leur transmettant dans certaines conditions les agents des endémies tropicales, l'hôte fermant le cycle d'un parasite déterminé ou au contraire arrêtant son cycle évolutif. Dans une localité donnée les femelles peuvent se gorger sur un ou plusieurs hôtes suivant leur préférence trophique, l'attraction vers l'un des hôtes pouvant être augmentée ou diminuée ou même annulée par l'apparition d'un nouvel hôte, provoquant une véritable déviation qui est conditionnée non seulement par l'espèce, mais encore par son habitat diurne et nocturne. Toute déviation animale nécessite la proximité de l'hôte déviateur et de l'hôte dont le moustique a été dévié. On voit ainsi le grand intérêt de la détermination exacte de l'hôte puisque le facteur de préférence trophique vers une

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 février 1954.

espèce est lié à tout un complexe (habitat divers, comportement diurne ou nocturne, éventuel rapprochement ou éloignement des gîtes larvaires des moustiques).

De même est évident l'intérêt épidémiologique de détermination des hôtes au cours des différentes enquêtes malarialogiques pour expliquer la gravité d'une endémie ou épidémie.

DÉVIATION ANIMALES. ÉCRAN PROTECTEUR.

On connaît le rôle dans la transmission des parasites par les insectes hématophages, des écrans protecteurs réalisés par certains animaux qui, déviant le moustique de l'homme, protègent en fait celui-ci. Dans certaines régions pauvres en animaux sauvages et animaux domestiques, les moustiques se gorgent presque exclusivement sur l'homme, transmettant l'hématzoaire responsable des endémies locales. Dans d'autres régions, le cycle éventuel homme-moustique est plus ou moins interrompu, le parasite étant intercepté par un deuxième hôte (bœuf dans le cas des régions d'élevage). Dans ce dernier cas, l'hématzoaire humain transmis au bœuf voit son cycle interrompu par épuisement des sporozoites des glandes salivaires du moustique sur le bœuf. Dans d'autres cas, par contre, un deuxième hôte pourra servir de véritable réservoir de virus, comme certains singes de la forêt tropicale le font pour le virus amaril.

On peut voir, en effet, les tendances trophiques naturelles se modifier à un certain degré, soit à la suite de l'introduction d'un animal dans une région donnée, soit par la disparition d'une espèce, soit enfin par le changement d'habitat d'une espèce animale. Ces modifications peuvent à leur tour avoir pour conséquence une modification du comportement des moustiques augmentant ou diminuant leur anthropophilie ou leur zoophilie, c'est-à-dire rendant possible une déviation vers un animal donné ou au contraire faisant de l'homme un hôte exclusif.

La nécessité de l'identification de l'origine spécifique du sang ingéré par les moustiques s'est montrée de plus en plus indispensable à l'organisation de la lutte anti-paludique. En effet, l'introduction dans cette lutte des insecticides tels que le D. D. T. en Afrique Noire et à Madagascar a rendu de nouveau son acuité à la question des préférences trophiques des anophèles. Dans certaines régions de Madagascar, par exemple, on a vu la faune anophélienne presque disparaître des habitations humaines grâce à l'emploi des insecticides et persister à un certain degré dans les étables, bien que celles-ci aient été aussi bien traitées. La question de savoir si les anophèles se gorgeaient exclusivement sur les bœufs ou migraient dans les étables après s'être gorgés sur l'homme demandait à être éclaircie. La question des

différents aspects du paludisme à Madagascar s'est également posée à nous, demandant une solution qui pouvait entraîner l'intensification de la lutte imagocide ou une économie d'insecticides. En effet, seul le degré d'anthropophilie peut indiquer les régions dangereuses.

L'identification du sang ingéré par les moustiques devrait être normalement à la base de toute enquête entomologique. En effet, cette réaction d'identification, qui jusqu'ici utilisait la réaction de précipitation interfaciale, avait été peu à peu abandonnée par de nombreux chercheurs à cause de la difficulté de son exécution et de l'inconstance de ses résultats. Néanmoins, cette réaction de précipitation a permis de donner des explications justes et valables, notamment dans le cas d'endémie palustre grave par une simple démonstration de l'anthropophilie anophélienne, ou au contraire, dans le cas d'endémie palustre atténuee, de l'existence d'une zoophilie prononcée.

MÉTHODES DE DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE UTILISÉES.

La détermination de l'origine spécifique des hématies absorbées au cours du repas infectant par les insectes hématophages et en particulier par *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, *Anopheles maculipennis* var. *atroparvus* peut se faire à l'aide de deux méthodes utilisant toutes deux la réaction antigène-anticorps dont l'une fait appel à la réaction de précipitation (les anticorps utilisés étant des précipitines spécifiques) et dont l'autre utilise la réaction d'agglutination due à l'union de l'hémagglutinogène porté par les hématies et d'un anticorps agglutinant contenu dans un immunisérum.

Cette méthode d'hémagglutination, par sa simplicité d'exécution et de lecture, par l'obtention de la conservation après lyophilisation des sérum-tests puissants rendant possible leur transport et leur emploi sous tous les climats, semble en tous points préférable, dans ce cas particulier, à la délicate réaction de précipitation utilisée en médecine légale pour l'identification des taches de sang.

I. — RÉACTION DE PRÉCIPITATION INTERFACIALE.

Cette méthode consiste à mettre en contact par superposition dans des tubes de 3 mm de diamètre des dilutions d'anticorps en présence d'une solution concentrée d'antigène. Lorsque la réaction se produit, elle se traduit par l'apparition d'un anneau de précipitation à la limite des deux phases liquides. D'autres méthodes plus fines, telle que l'étude de la précipitation spécifique en milieu gélifié (Oudin, 1946), ont rendu possible l'analyse immuno-chimique et ont permis d'identifier certains antigènes.

Cette réaction peut se faire soit en tube par mélange de l'immunsérum et de la gélose, puis par diffusion de l'antigène dans ce mélange, soit en boîte de Petri, les deux antigènes à comparer étant mis dans deux réservoirs creusés dans de la gélose, l'immunsérum placé dans un troisième réservoir disposé au sommet d'un triangle équilatéral (technique d'Ouchterlony).

La méthode de précipitation interfaciale ne tient pas suffisamment compte des antigènes communs qui existent chez certains groupes d'animaux, et n'arrive à une spécificité relative que par de fortes dilutions des anti-séums. En effet, tout anti-sérum insuffisamment dilué est susceptible de provoquer des réactions positives avec tout un groupe d'animaux apparentés entre eux, d'où nécessité de le diluer jusqu'à un taux auquel les réactions provoquées par les antigènes spécifiques sont encore perceptibles, tandis que les traces de réaction provoquée par le reste des anticorps hétérophiles ne sont plus décelables par les méthodes courantes. De plus, la préparation des sérum précipitants est parfois difficile lorsqu'on désire obtenir un anticorps de titre élevé. La dilution de ces sérum ne permet pas toujours d'observer une précipitation spécifique vis-à-vis d'un seul animal. L'immunisation prolongée de lapins par exemple peut entraîner une diminution de la spécificité de l'anticorps. D'une manière générale, les réactions de précipitation ne peuvent être réalisées que dans un laboratoire suffisamment équipé.

II. — TECHNIQUE DE L'IDENTIFICATION DU SANG INGÉRÉ PAR LES MOUSTIQUES A L'AIDE DE LA RÉACTION D'HÉMAGGLUTINATION.

Il était donc logique d'étudier l'aptitude de la *réaction d'hémagglutination* à l'identification de l'origine spécifique du sang ingéré par les moustiques hématophages. En effet, la sensibilité de la réaction d'hémagglutination est bien plus grande que celle de la réaction de précipitation. La réaction d'hémagglutination permet d'opérer sur de très petites quantités de sang, la lecture microscopique pouvant être effectuée rapidement, mais elle nécessite la présence d'une certaine proportion de globules rouges intacts. Le problème se ramenait donc à l'évaluation du temps de conservation morphologique et antigénique des globules rouges ingérés par les moustiques. Nous avons utilisé la technique de micro-agglutination couramment pratiquée pour la mise en évidence de certains agglutinogènes érythrocytaires chez l'homme, en nous servant de faibles quantités de sang et de faibles quantités de sérum. Les immunséums agglutinants utilisés ont été les suivants : sérum de chèvre, lapin, singe, cheval, bœuf anti-globules rouges humains, puis sérum de lapin, de cobaye, de mouton anti-globules de bœuf et sérum de lapin, de chèvre, de cheval anti-globules rouges de mouton. Ces séums ont été obtenus par

immunisation d'animaux à l'aide de suspension de globules rouges lavés. L'immunisation a été réalisée d'abord par une série d'injections intraveineuses, puis une série d'injections intramusculaires et intrapéritonéales poursuivies pendant six à huit semaines. Lorsque les sérum présentent un titre agglutinant suffisant, en moyenne 1/4 000 vis-à-vis de globules rouges mis en suspension dans l'eau physiologique, on a réalisé une absorption du sérum décomplémenté, à l'aide de globules rouges d'autres espèces animales pour lesquelles il y a eu apparition d'anticorps agglutinant due à une communauté antigénique.

Un titrage de l'immunsérum est réalisé au préalable dans une série de 12 tubes à hémolyse par exemple, où on met 0,3 ml d'eau physiologique et en plus, dans le premier tube, 0,3 ml du sérum ; après mélange dans le premier tube on reporte 0,3 ml dans le deuxième tube et on opère de même pour les tubes suivants ; on obtient ainsi des dilutions de sérum comprises entre 1/2 et 1/4 000 par exemple. Dans chaque tube on ajoute 0,05 ml d'une suspension en eau physiologique des globules rouges à étudier. On laisse les tubes quinze à trente minutes à la température du laboratoire et on centrifuge à 1 000 tours pendant une minute, puis on effectue la lecture à l'aide d'un miroir concave, la dernière dilution qui donne encore une agglutination exprime le titre.

Absorption des agglutinines non spécifiques. — Pour obtenir un immunsérum doué d'une étroite spécificité, c'est-à-dire agglutinant, à l'exclusion de tout autre, les hématies d'une espèce animale et d'une seule, il faut débarrasser ces sérum des agglutinines hétéro-spécifiques qu'il contient. On peut obtenir cette spécificité en pratiquant une absorption dix-huit heures à + 4° par des globules appropriés. Par exemple, si l'on a obtenu par immunisation un sérum de chevreau anti-humain destiné à distinguer les globules humains des globules de bœuf et des globules rouges de cheval, il est évident que, si ce sérum n'est pas absorbé par des globules de bœuf et de cheval, il est capable d'agglutiner les trois catégories de globules rouges ; mais après absorption par des globules de bœuf et par des globules de cheval, il n'agglutine plus que des globules humains, permettant ainsi de distinguer l'origine humaine de l'origine animale (bœuf et cheval) des hématies examinées.

On réalise ces absorptions en mettant en présence le sérum à absorber avec une quantité convenable de culot de globules rouges lavés quatre fois, dans au moins cinq fois leur volume d'eau physiologique, par centrifugation, décantation et remise en suspension en eau physiologique. On laisse en contact sérum et globules pendant seize heures à la glacière. On sépare ensuite sérum et culot globulaire par centrifugation et on examine le

sérum par rapport à des globules rouges de la même espèce animale que ceux qui ont servi à réaliser l'absorption et par rapport à des globules rouges contre lesquels l'immunsérum est spécifiquement dirigé.

Les moustiques utilisés pour les expériences provenaient de l'élevage permanent et étaient gorgés dans de petites cages en tulle modèle Roubaud, sur lapin, cobaye, souris, bœuf et homme. Les moustiques appartenaient aux espèces suivantes : *Aedes aegypti* (Linné), *Anopheles stephensi* (Liston), *Anopheles maculipennis* var. *atroparvus* (Van Thiel).

Les moustiques gorgés sont pris avec un aspirateur à bouche et endormis au chloroforme. La dissection se fait avec deux épingle ou aiguilles lancéolées. L'abdomen est séparé d'abord du thorax, puis l'estomac est extrait de l'abdomen par simple pression sur l'incision abdominale. Une fois extrait, l'estomac est placé dans une grosse goutte d'eau physiologique à 8,5 p. 1 000, on presse alors avec une épingle sur la paroi stomachale pour que le sang qu'il contient émerge par la partie antérieure et postérieure dans la goutte d'eau. On peut aussi bien dilacerer les parois stomachales avec les épingle de façon à avoir le maximum de sang si le moustique est peu gorgé. De toute façon, une fois que le sang se trouve dans l'eau physiologique, il est absolument nécessaire de bien disloquer l'amas de globules rouges avec l'épingle jusqu'à disparition de ces pseudo-agglutinats. On vérifie microscopiquement que les globules rouges se trouvent bien dissociés dans l'eau physiologique. Si l'on veut pratiquer deux ou trois réactions avec des anti-sérum différents, on divise le sang ainsi recueilli en eau physiologique en deux ou trois gouttes.

Cette réaction d'agglutination peut se faire sur lame ou sur papier bristol. L'anti-sérum peut être employé à l'état pur ou dilué selon son avidité et son titre. Il est préférable pour avoir des réactions facilement lisibles d'utiliser une goutte de sérum pur dilué à moins de 1/10. Le sang et le sérum mis en présence, on agite légèrement la lame pour que le mélange soit bien homogène et on attend deux à cinq minutes avant la lecture directe suivie d'une lecture microscopique au faible grossissement. Les réactions positives sont toujours très nettes facilement lisibles à l'œil nu comme on peut le voir sur les photographies jointes.

L'anti-sérum, par exemple anti-sérum anti-globules rouges humains, choisi pour la réaction sera absorbé par les globules rouges des animaux qui entourent l'homme dans la localité donnée. En général, il suffira de l'absorber par des globules rouges des animaux domestiques, notamment bœuf, cheval, chien, et porc. Pour une localité donnée, il sera bon de faire une réaction avec les anti-sérum pour l'animal présumé être le véritable hôte des moustiques et, aussi, des réactions avec les anti-sérum

pour les animaux domestiques (mammifères ou oiseaux suivant que les globules rouges sont nucléés ou non) présents dans la localité. Par exemple, on effectuera 100 réactions avec le sérum anti-globules rouges humains absorbé par les globules rouges des autres animaux, 100 avec le sérum anti-globules rouges de bœuf absorbé de la même façon, etc.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de nos expé-

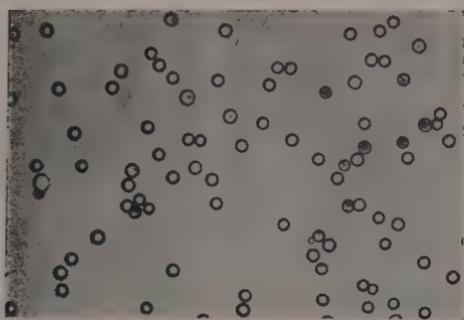


FIG. 1. — Microphotographie de réaction négative : Les globules sont libres.



FIG. 2. — Microphotographie de réaction positive : les globules forment des agglutinats.

riences répondent aux questions suivantes : y a-t-il ou non modification antigénique de la structure des hématies dans l'estomac du moustique, quel est le rapport entre la dilution des anti-sérum absorbés et non absorbés avec leur spécificité, quel est le rapport entre le titre du sérum et la possibilité d'effectuer la réaction sur lame, quelle est l'influence de la digestion sur la spécificité de la réaction (temps de survie des hématies à l'intérieur de l'estomac)?

CONCLUSIONS TIRÉES DES EXPÉRIENCES EFFECTUÉES.

1^o Temps de survie des hématies à l'intérieur de l'estomac des

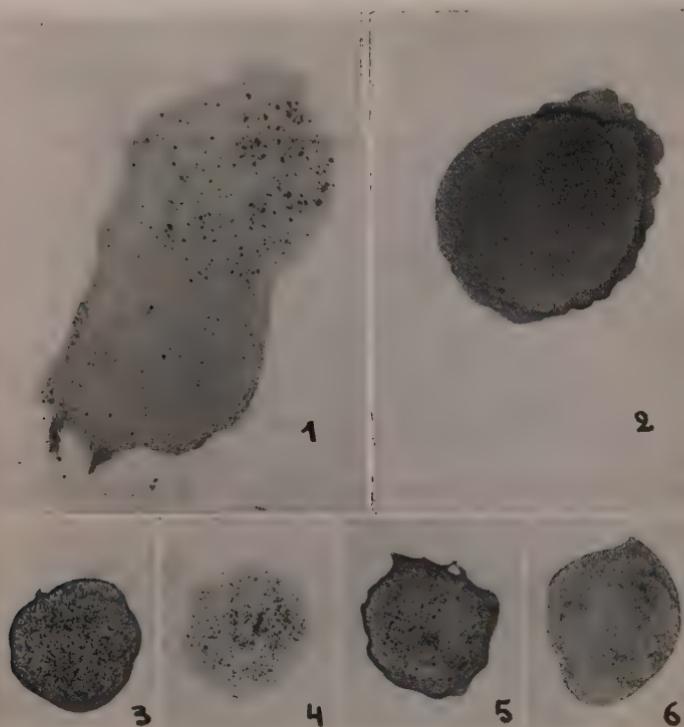


FIG. 3 (macrophoto) 1. *Anopheles maculipennis* variété *atroparvus*, sang lapin plus sérum de cobaye anti-lapin après six heures de digestion, réaction d'agglutination positive; 2. Réaction témoin : même sang, sans sérum anti-lapin, réaction d'agglutination négative; 3. *Aedes aegypti* gorgé de sang humain appartenant au groupe A plus sérum test anti-A après six heures de digestion, réaction d'agglutination positive; 4. *Aedes aegypti* gorgé avec du sang de souris plus sérum de lapin anti-globules rouges de souris après cinq heures de digestion, réaction d'agglutination positive; 5. *Aedes aegypti* gorgé de sang humain plus sérum chevreau anti-homme après vingt-trois heures de digestion, réaction positive; 6. *Aedes aegypti* gorgé de sang humain plus sérum de lapin anti-globules rouges de souris absorbé par des globules rouges humains de groupe AB après sept heures de digestion, réaction d'agglutination négative.

moustiques. — a) D'après les expériences 4 et 8 nous voyons que non seulement les hématies survivent plus de douze heures, mais aussi qu'un agglutinogène de groupe sanguin humain tel

que l'agglutinogène A reste facilement décelable au moins douze heures.

b) D'après les expériences du n° 25 à 48, nous voyons que les réactions restent positives et facilement lisibles à l'œil, sans microscope au moins pendant les douze heures qui suivent la piqûre du moustique, qu'il s'agisse d'*Anopheles stephensi* ou *Aedes aegypti*.

2^e Spécificité des réactions, problèmes de la modification antigénique de la structure des hématies. — Les réactions pratiquées avec différents sanguins d'animaux à l'aide des anti-sérum spécifiques absorbés ou non par les globules rouges correspondants nous ont montré que les hématies ingérées n'ont pas subi de modification antigénique pendant les douze premières heures de digestion.

Les quatre expériences faites avec les moustiques gorgés sur homme, bœuf, cobaye, lapin, souris, montrent bien que la structure antigénique des hématies n'est pas modifiée et permet les réactions d'agglutination spécifique.

3^e Degré de spécificité de ces réactions d'agglutination en rapport avec le taux de dilution des anti-sérum. — Nous voyons que des réactions peuvent garder leur spécificité même à des taux pouvant atteindre 1/200, mais évidemment variables suivant les sérum utilisés. Dans le cas des sérum non absorbés, on atteint rapidement la spécificité dans un groupe d'animaux apparentés par simple dilution du serum, mais cette spécificité doit être garantie par de nombreux témoins. Il est à noter que les groupes d'animaux éloignés du point de vue antigénique ne présentent pas de réaction mixte avec les sérum non absorbés à l'état pur ou faiblement dilués selon la parenté plus ou moins grande entre les hématies ingérées et les globules rouges qui ont servi à fabriquer les anti-sérum. Dans le cas où l'on voudrait pratiquer des réactions sur des sérum non absorbés il serait indispensable de prendre comme témoins les différents animaux de la localité qu'on étudie.

4^e Rapport entre les taux d'hémagglutination des hématies ingérées et le titre du serum obtenu par la méthode d'agglutination d'hématies intactes par centrifugation. — Les taux d'agglutination sur lame des hématies ingérées est inférieur de 2 à 4 dilutions au titre réel. Expériences 9 et 12, 13 à 22, 52 à 62.

CONCLUSIONS.

La méthode immunologique d'identification des origines spécifiques des hématies ingérées par les moustiques, méthode utilisant la réaction d'agglutination, est rendue possible par l'emploi d'anti-sérum dont la spécificité a été obtenue par absorption des hétéro-

N°	Espèce de moustique employé	Animal hôte	Temps de digestion	Anti-sérum employé	Titre du sérum	Réaction d'agglutination
1	A. stephensi	Homme A	6 h.	Cheval anti-G.R. humains	I/2048	positive
2	"	"	"	Chevreau anti-G.R. humains	I/4000	positive
3	A. aegypti	Homme A	6 h.	Cheval anti-G.R. humains	I/2048	positive
4	A. stephensi	Homme A	6 h.	Sérum test anti-A	"	positive
5	"	"	12 h.	"	"	positive
6	A. aegypti.	Homme A	6 h.	Sérum test anti-A	"	positive
7	"	"	12 h.	Lapin anti-G.R.	"	positive
8	"	"	2 h.	Souris absorbés par G.R. humains AB	"	négative
9	"	Homme A	3 h.	Chevreau anti-G.R. humains dilué 1/512	"	positive
10	"	"	"	à 1/100	"	positive
11	"	"	"	à 1/500	"	négative
12	"	"	"	à 1/1000	"	négative
13	A. stephensi	Homme A	3 h.	Lapin anti-Globules ON	"	positive
14	"	"	"	à 1/2	I/2048	positive
15	"	"	"	à 1/4	"	positive
16	"	"	"	à 1/8	"	positive
17	"	"	"	à 1/16	"	positive
18	"	"	"	à 1/32	"	positive
19	"	"	"	à 1/64	"	positive
20	"	"	"	à 1/128	"	positive
21	"	"	"	à 1/256	"	négative
22	"	"	"	à 1/512	"	négative
23	"	"	"	à 1/1024	"	négative
24	"	"	"	Cobaye anti-G.R. lapin pur	"	positive
25	"	"	2 h.	Cheval anti-G.R. humains	I/2048	positive
26	"	"	4 h.	"	"	positive
27	"	"	6 h.	"	"	positive
28	"	"	8 h.	"	"	positive
29	"	"	10 h.	"	"	positive
30	"	"	12 h.	"	"	positive
31	A. stephensi	Homme A	2 h.	Chevreau anti-G.R. humains	I/1024	positive
32	"	"	4 h.	"	"	positive
33	"	"	6 h.	"	"	positive
34	"	"	8 h.	"	"	positive
35	"	"	10 h.	"	"	positive
36	"	"	12 h.	"	"	positive
37	A. aegypti	Homme A	2 h.	Cheval anti-G.R. humains	I/2048	positive
38	"	"	4 h.	"	"	positive
39	"	"	6 h.	"	"	positive
40	"	"	8 h.	"	"	positive
41	"	"	10 h.	"	"	positive
42	"	"	12 h.	"	"	positive
43	"	"	2 h.	Chevreau anti-G.R. humains	I/1024	positive
44	"	"	4 h.	"	"	positive
45	"	"	6 h.	"	"	positive
46	"	"	8 h.	"	"	positive
47	"	"	10 h.	"	"	positive
48	"	"	12 h.	"	"	positive
49	A. stephensi	Bœuf	6 h.	Lapin anti-globules de bœuf	"	positive
50	"	"	"	"	"	positive
51	"	Cobaye	7 h.	Chevreau anti-G.R. humains	"	négative
52	A. maculipennis var. astrotarparus	Lapin	5 h.	Cobaye anti-G.R. lapin	I/4096	positive
53	"	"	5 h.	à 1/2	"	positive
54	"	"	"	à 1/4	"	positive
55	"	"	"	à 1/8	"	positive
56	"	"	"	à 1/16	"	positive
57	"	"	"	à 1/32	"	positive
58	"	"	"	à 1/64	"	positive
59	"	"	"	à 1/128	"	positive
60	"	"	"	à 1/256	"	positive
61	"	"	"	à 1/512	"	positive
62	"	"	"	à 1/1024	"	négative
63	A. aegypti	Souris	4 h.	Lapin anti-GR souris	I/1096	positive
64	"	"	"	"	"	positive
65	"	"	"	sans aucun sérum témoin	"	négative
66	A. aegypti	Souris	5 h.	G.R. de souris dilué à 1/50	I/1096	positive
67	"	"	"	Cheval anti-G.R. humain dilué à 1/50	I/1024	négative

agglutinines par des globules rouges d'animaux différents de l'espèce qui a servi à la fabrication des anticorps agglutinants. Nous avons vu de plus que la survie des hématies à l'intérieur de l'estomac du moustique est suffisamment longue pour que les réactions puissent être pratiquées même douze heures après l'ingestion de sang, la structure antigénique des hématies n'ayant subi pendant ce temps aucune modification.

Du point de vue application pratique, cette méthode d'identification des hématies ingérées par les moustiques ou divers insectes hématophages peut rendre de grands services, dans différentes enquêtes épidémiologiques, au cours des endémies tropicales dont les vecteurs sont des moustiques ou d'autres insectes hématophages (Phlébotomes, Cératopogonides, Tiques, etc.).

Cette méthode peut éventuellement rendre service dans l'orientation de la recherche du cycle de certains parasites ou virus dont les hôtes intermédiaires sont encore inconnus, permettant l'identification des réservoirs de virus et même souvent des vecteurs. Dès maintenant, il nous semble qu'on doive utiliser la réaction d'hémagglutination dans le cas où les hématies ingérées par les insectes hématophages ont conservé leur morphologie et, dans les cas intermédiaires, associer cette réaction à la réaction de précipitation. Cette dernière conserve toutes ses indications dans le cas où les hématies ont été digérées.

Nous tenons à remercier le Dr Toumanoff qui a mis son insectarium à notre disposition, et M^{me} Lapied pour son aide technique.

RECHERCHES SUR LA COMPOSITION ANTIGÉNIQUE DES STAPHYLOCOQUES NON PATHOGÈNES

I. — MISE EN ÉVIDENCE D'AGGLUTINOGÈNES SPÉCIFIQUES ET D'UN AGGLUTINOGÈNE COMMUN AUX SOUCHES PATHOGÈNES ET NON PATHOGÈNES

par J. PILLET et B. ORTA (*).

(*Institut Pasteur. Annexe de Garches.*)

Les recherches ayant pour objet l'étude de la composition antigénique des staphylocoques non pathogènes sont peu nombreuses et, parmi celles utilisant la technique de l'agglutination spécifique, nous ne citerons que celles de Julianelle et Wieghard [1] qui, utilisant des sérum non absorbés, ne sont pas parvenus à différencier les souches pathogènes des souches non pathogènes, et celles de P. OEding [2] qui a montré récemment qu'à l'aide d'un sérum absorbé, préparé à partir d'une souche contenant les deux agglutinogènes qu'il considère comme caractéristiques de la majorité des souches pathogènes, il obtenait, dans 98 p. 100 des cas, une agglutination avec les souches pathogènes et dans 3,3 p. 100 des cas seulement, une agglutination avec les souches non pathogènes. Ce dernier travail, s'il met bien en évidence le peu de réactivité des souches non pathogènes vis-à-vis des sérum anti-pathogènes, présente l'inconvénient de ne pas se référer aux souches pathogènes qui paraissent devoir être considérées comme souches types (souches I, II, III de Cowan et 4 à 9 de Christie et Keogh) et n'apporte, par ailleurs, aucun renseignement positif sur la composition antigénique des souches non pathogènes. Dans un travail précédent [3] nous avons constaté que sur 61 souches non pathogènes, isolées sur 31 nourrissons, nous n'avions pu typer, à l'aide de sérum anti-pathogène absorbé, que 10 d'entre elles, la plupart appartenant au type 6, type rencontré exceptionnellement parmi les souches pathogènes. Le fait que 83,7 p. 100 des souches non pathogènes isolées dans ce travail n'aient pu être typées par les sérum anti-pathogène absorbé implique, soit l'absence d'agglutinogènes spécifiques à la surface de la majorité des souches non pathogènes, soit l'existence d'agglutinogènes spécifiques dif-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 mars 1954.

férents de ceux mis en évidence chez les staphylocoques pathogènes.

Le travail actuel a en particulier pour but de permettre de choisir entre ces deux possibilités, et de rechercher par ailleurs si la technique de l'agglutination peut être utilisée en vue de l'identification des staphylocoques non pathogènes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1^o SOUCHEs. — a) *Pathogènes.* — Les neuf souches utilisées ont été les souches I, II, III de Cowan [4] et les souches 4, 5, 6, 7, 8, 9 de Christie et Keogh [5]. L'individualité antigénique de ces souches a été vérifiée antérieurement [6, 7].

b) *Non pathogènes.* — Nous avons choisi dix souches isolées sur dix malades différents, non typables par la sérologie, et donnant des résultats négatifs aux tests de pathogénie habituels.

2^o PRÉPARATION ET ABSORPTION DES ANTI-SÉRUMS. AGGLUTINATION. — Les différentes techniques utilisées dans ce travail ont été décrites antérieurement à l'occasion de recherches sur la composition antigénique des staphylocoques pathogènes [6, 7, 8].

RÉSULTATS.

Nous envisagerons successivement l'étude des taux d'agglutination des souches pathogènes et non pathogènes par les sérumS anti-pathogènes et anti-non pathogènes et comparerons ensuite les résultats obtenus avec ceux notés avec les mêmes sérumS après absorption.

TAUX D'AGGLUTINATION DES SÉRUMS ANTI-PATHOGÈNES VIS-A-VIS DES SOUCHEs DES DEUX TYPES. — Les taux constatés varient évidemment d'un sérum à l'autre mais, en règle générale, les résultats obtenus se résument ainsi : les souches pathogènes, et en particulier les souches homologues et les souches riches en agglutinogène commun, sont habituellement agglutinées au 1/1 000 par les sérumS anti-pathogènes, alors que les souches non pathogènes dépassent rarement le taux de 1/50 lorsqu'on les teste avec ces mêmes sérumS.

TAUX D'AGGLUTINATION DES SÉRUMS ANTI-NON PATHOGÈNES VIS-A-VIS DES SOUCHEs DES DEUX TYPES. — Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant dans lequel sont notées les agglutinations constatées avec chacun des sérumS dilués au 1/500 (les réactions sont notées de 1 à 4 selon leur intensité).

TABLEAU I.

Anti-sérum	Souches pathogènes									Souches non pathogènes									
	I	II	III	4	5	6	7	8	9	181	186	242	260	280	289	295	300	322	433
181	0	1	4	3	1	4	1	2	4	0	0	0	0	0	4	0	1	4	1
186	1	2	4	4	2	6	4	4	4	0	0	0	0	0	3	0	5	0	0
242	0	0	4	5	0	4	1	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
260	0	0	4	3	0	4	2	2	2	0	0	0	2	0	4	0	1	0	0
280	0	0	3	1	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0	5	0	1	0	0
289	0	0	4	2	0	4	0	2	1	0	0	0	5	3	4	4	1	0	0
295	0	1	4	4	2	4	3	3	4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
300	0	1	4	3	0	4	3	3	4	0	2	1	2	0	0	0	4	0	0
322	0	2	4	4	3	4	4	4	4	0	0	0	0	0	4	1	1	2	0
433	0	1	3	3	1	4	3	3	4	0	0	0	0	0	2	0	1	3	1

On peut tirer de l'examen de ce tableau les conclusions suivantes :

1° Bien que les souches non pathogènes ne soient agglutinées qu'à des taux très faibles par les sérum anti-pathogènes, elles peuvent, lorsqu'on les injecte à l'animal, déterminer la formation d'anticorps agglutinant les souches pathogènes à un titre élevé. Nous reviendrons plus loin sur ces résultats apparemment contradictoires et noterons ici seulement qu'il est nécessaire, pour expliquer le dernier, d'admettre l'existence d'un agglutinogène commun à la surface des souches pathogènes et non pathogènes. L'absorption de ces sérum par la souche pathogène I confirmera ce point de vue.

2° Si l'on étudie les taux d'agglutination des souches pathogènes, on peut faire deux remarques : a) la prédominance des souches III, 4, 8 est moins nette qu'avec les sérum préparés à partir des souches pathogènes [6], en particulier en ce qui concerne la souche 8. Cela peut être dû au fait qu'il s'agit de sérum préparés à l'aide de souches non pathogènes, mais ce résultat peut aussi s'expliquer par une faible variation de la quantité d'agglutinogène commun à la surface des neuf souches types. Nous avons en effet remarqué, au cours de plusieurs années d'observations, des variations légères dans les taux des sérum non absorbés qui semblent s'expliquer de cette façon.

b) On constate l'existence d'une forte agglutination anti-6 qui paraît caractéristique des dix sérum étudiés.

3° L'examen des taux d'agglutination des souches non pathogènes montre qu'à part la souche 289, ces souches ne sont agglutinées qu'à des taux très généralement inférieurs à ceux constatés avec les souches pathogènes.

ABSORPTION DES SÉRUMS ANTI-PATHOGÈNES.

L'absorption de ces sérum s a été réalisée à l'aide de la souche I qui possède un pouvoir absorbant élevé.

Les résultats obtenus pouvaient être prévus à l'avance, étant donné que ces absorptions étaient analogues à celles effectuées antérieurement en vue d'obtenir des sérum s anti-pathogènes spécifiques, et qu'aucune des souches non pathogènes utilisées ici n'avait réagi avec les sérum s ainsi obtenus.

C'est pourquoi, mise à part la confirmation de résultats constatés précédemment, ces expériences avaient surtout pour but de comparer, d'une façon systématique, les résultats de l'absorption des sérum s anti-pathogènes et anti-non pathogènes. La dilution des sérum s (1/50) et leur volume (2,5 cm³) étant maintenus constants, seul le poids de germes secs utilisés dans l'absorption a varié : 15 mg de germes I pour les sérum s anti-pathogènes, 100 mg pour les sérum s anti-non pathogènes.

Nous avons obtenu dans ces conditions neuf sérum s agglutinant nettement leur souche homologue, donnant encore quelques réactions croisées et n'agglutinant aucune des dix souches non pathogènes étudiées dans ce travail. Ces résultats s'opposent de façon significative à ceux obtenus avec les sérum s anti-non pathogènes que nous étudierons maintenant.

ABSORPTION DES SÉRUMS ANTI-NON PATHOGÈNES.

Chacun des sérum s préparés à partir des dix souches non pathogènes a été absorbé dans les conditions précisées plus haut : dilution 1/50, volume 2,5 cm³, poids de germes I : 100 mg. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

TABLEAU II.

Anti-sérum s	Souches pathogènes									Souches non pathogènes									
	I	II	III	4	5	6	7	8	9	181	186	242	260	280	289	293	300	322	433
181	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	2	0	0	3	I	0	4	4
186	0	0	0	0	0	I	0	0	0	4	4	2	4	4	4	3	2	4	4
242	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	I	0	0	0	0
260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	4	4	4	0	0	0
280	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3	I	4	4	4	3	0	0	0
289	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	4	4	4	0	I	0
293	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3	2	4	4	4	4	I	0	0
300	0	0	I	0	0	4	0	0	0	0	4	I	3	4	I	I	4	0	0
322	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	I	2	I	4	4	0	4	4
433	0	0	0	0	0	2	0	0	0	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4

L'examen de ce tableau permet les constatations suivantes : alors que les sérum anti-non pathogènes non absorbés agglutinent comme on l'a vu les souches pathogènes à des taux plus élevés que les souches non pathogènes, les résultats sont très différents après absorption de ces sérum.

On constate, en effet, dans ces conditions la persistance d'agglutinations très marquées à l'égard de la plupart des souches non pathogènes, alors que les souches pathogènes ne sont pratiquement plus agglutinées à l'exception de la souche 6 qui donne encore lieu à des agglutinations faibles ou modérées avec cinq des sérum testés.

On peut tirer de ces résultats les conclusions suivantes :

1^o On notera tout d'abord que la diversité des réactions d'agglutination obtenues avec ces sérum et les souches non pathogènes semble exclure que ces réactions soient dues à la présence du seul agglutinogène 6 à la surface des souches non pathogènes. Le fait que le sérum absorbé anti-6 n'agglutine aucune des souches non pathogènes étudiées ici confirme d'ailleurs ce point de vue.

Il semble donc bien qu'il faille rapporter l'agglutination sélective des staphylocoques non pathogènes par les sérum préparés à partir de ces souches et convenablement absorbés, à l'existence d'agglutinogènes spécifiques à la surface des staphylocoques non pathogènes.

2^o La disparition des agglutinines agissant sur les souches pathogènes, après absorption des sérum anti-non pathogènes par la souche pathogène I, confirme par ailleurs l'existence d'un agglutinogène commun aux staphylocoques pathogènes et non pathogènes.

3^o La présence d'agglutinines résiduelles anti-6 après absorption des sérum anti-non pathogènes et le fait qu'il ait été possible dans un travail antérieur [3] de classer certaines souches non pathogènes dans le groupe 6, indiquent que cet agglutinogène semble jouer un rôle intermédiaire qu'il y aura lieu de préciser ultérieurement.

REMARQUES. — Nous ferons maintenant deux remarques au sujet de certains des résultats obtenus.

La première concerne la possibilité pour les souches non pathogènes de donner des sérum agglutinant les souches pathogènes à un taux élevé, alors qu'elles-mêmes ne sont agglutinées qu'à des titres très bas par les sérum anti-pathogènes.

Ce fait confirme des expériences antérieures, non publiées, ayant pour objet l'étude des propriétés de sérum préparés à l'aide d'une même souche s'étant développée sur deux milieux différents. Les germes provenant des deux types de milieux étaient agglutinés à des taux très différents, 1/100 et 1/1 000 par le même

anti-sérum, alors qu'injecté à l'animal ils permirent d'obtenir des sérums dont les taux étaient pratiquement identiques.

Les résultats obtenus dans le travail actuel ne doivent donc pas surprendre et indiquent simplement qu'il semble difficile pour l'instant d'établir un rapport entre la quantité d'agglutinogènes existant à la surface d'une souche et le taux des agglutinines constaté, lorsque cette souche est utilisée comme antigène.

Le second point sur lequel nous voulons attirer l'attention est la diversité des réactions obtenues lorsque l'on teste les dix souches non pathogènes par chacun des sérums anti-non pathogènes absorbés.

Ces différents types de réactions impliquent l'existence de plusieurs agglutinogènes spécifiques à la surface des souches non pathogènes, car la présence d'un agglutinogène commun aux souches non pathogènes, même si elle était reconnue dans la suite, ne pourrait expliquer d'une façon satisfaisante les réactions aussi différentes que celles observées par exemple avec les souches 181 et 260.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Dix-neuf sérums préparés à partir des neuf souches de staphylocoques pathogènes types et de dix souches non pathogènes isolées sur dix malades différents ont été étudiés avant et après absorption par la technique de l'agglutination.

Les conclusions suivantes peuvent être tirées de ce travail :

1° Les sérums anti-non pathogènes agglutinent les staphylocoques pathogènes à des taux élevés et les agglutinines ainsi mises en évidence peuvent être absorbées sélectivement par une souche pathogène (souche I). Ces résultats permettent de considérer comme très probable l'existence d'un agglutinogène commun aux souches pathogènes et non pathogènes à la surface des staphylocoques non pathogènes.

2° Chacun des sérums anti-non pathogènes, après absorption des agglutinines communes, agglutine nettement plusieurs des souches non pathogènes, ce qui implique l'existence d'agglutinines agissant spécifiquement sur les souches non pathogènes, et en conséquence, celle d'agglutinogènes spécifiques à la surface de ces souches.

La diversité des réactions obtenues permet de penser qu'il existe très probablement plusieurs types de staphylocoques non pathogènes identifiables par la sérologie.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. JULIANELLE et C. WIEGHARD. *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 11.
- [2] P. OEDING. *Acta. Path. Micr. Scand.*, 1953, **32**, 187.

- [3] J. PILLET, J. CALMELS, B. ORTA et G. CHABANIER. Ces *Annales*, 1954, **86**, 309.
- [4] S. COWAN. *J. Path. a. Bact.*, 1938, **46**, 31.
- [5] R. CHRISTIE et E. KEOGH. *J. Path. a. Bact.*, 1940, **51**, 189.
- [6] J. PILLET, P. MERCIER et B. ORTA. Ces *Annales*, 1952, **82**, 488.
- [7] J. PILLET et B. ORTA. Ces *Annales*, 1953, **84**, 420.
- [8] J. PILLET et B. ORTA. Ces *Annales*, 1952, **82**, 465.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME DU BACILLE DE WHITMORE

par L. CHAMBON et P. DE LAJUDIE (*).

(*Institut Pasteur de Saigon.*)

L'étude de la croissance des bactéries dans un milieu salin approprié additionné de carbone organique et de différentes sources d'azote permet d'apprécier un aspect particulier de leur métabolisme : le pouvoir de synthèse des « métabolites essentiels » (1) indispensables à leur développement. Nous avons étudié à ce point de vue le comportement de *Malleomyces pseudo-mallei* dans des milieux synthétiques à base de carbone organique et d'azote, ce dernier soit sous forme ammoniacale, soit sous forme uréique, soit sous forme d'acides aminés.

I. — MATÉRIEL.

Il est fourni par 25 souches de bacilles de Whitmore dont :

— 23 sont d'origine humaine et ont été isolées par hémoculture, culture de pus ou de crachats chez des malades atteints de mélioïdose.

— 2 sont d'origine animale.

Leurs caractères biochimiques sont conformes aux descriptions classiques et notamment à celle de Lajudie et Brygoo (1953), et elles sont toutes pathogènes pour le cobaye.

II. — TECHNIQUES.

a) MILIEUX SYNTHÉTIQUES UTILISÉS. — Pour l'étude du métabolisme carboné et azoté, des sources de carbone et d'azote sont ajoutées au milieu salin de base de Lwoff, milieu dont la composition est la suivante :

(*) Société Française de Microbiologie. Séance du 7 janvier 1954.

(1) Cf. Pochon Nutrition Bactérienne in Dumas Bactériologie Médicale, 1951.

PO_4KH_2	1,2 g
$\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$	8,6 g
$\text{SO}_4\text{Mg}, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,2 g
Cl_2Ca	0,01 g
$\text{SO}_4\text{Fe}, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,0005 g
Eau bidistillée.	Q.S.P. 1 000 ml

Les milieux synthétiques ainsi constitués sont répartis dans des tubes à essai à raison de 5 ml par tube, puis stérilisés à 110° ou par trois chauffages à 100° pour ceux dont la formule comporte un glucide. Le pH est ajusté à 7,5 par addition de soude.

L'hydrolyse de l'urée, l'utilisation du carbone, du citrate de soude et des alcools éthylique et méthylque, la production d'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine ont été étudiées comparativement en milieux synthétiques et en milieux semi-synthétiques gélosés dont nous donnons plus loin la composition.

b) ENSEMENCEMENT. — *Milieux synthétiques.* — Un premier tube de milieu synthétique est ensemencé avec un inoculum très faible d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose ordinaire ; deux repiquages successifs effectués à l'öse dès apparition d'une culture macroscopiquement visible (vingt-quatre heures en général) permettent d'éliminer les métabolites qui auraient pu être entraînés avec l'inoculum initial. La lecture définitive est faite sur le 3^e tube.

Milieux semi-synthétiques gélosés. — L'ensemencement est effectué à partir d'une culture sur gélose de vingt-quatre heures.

III. — RÉSULTATS.

a) MÉTABOLISME AZOTÉ. — L'utilisation de l'azote ammoniacal est étudiée sur le milieu de composition suivante :

Sulfate d'ammonium	1,50 g
Glucose	2 g
Milieu de Lwoff	Q.S.P. 1 000 ml

Ce milieu donne une culture abondante avec un voile important pour les 25 souches de bacille de Whitmore.

Pour l'étude de la nutrition azotée à partir de l'azote aminé, nous avons utilisé le milieu de base de Lwoff, auquel nous avons ajouté 2,50 g par litre de chacun des acides aminés suivants :

Acides monoamino-monocarboniques . . . Glycocolle.
l-leucine.
dl-alanine.

Acides monoamino-dicarboniques . . . Asparagine.
 Ac. *d*-glutamique.

Acide diamino-monocarbonique	<i>d</i> -arginine base.
Acide aminé soufré	Chlorhydrate de cystéine.
Acides aminés dérivés	Du benzène : tyrosine. De l'imidazole : histidine. De l'indole : tryptophane.

Tous ces acides aminés, sauf le glycocolle, se comportent comme sources de carbone et d'azote utilisables par *Malleomyces pseudo-mallei*. Aucune souche ne se développe en présence de glycocolle sans l'adjonction de glucose (2 g p. 1 000) au milieu de culture.

La croissance est lente et demande un inoculum important avec la leucine ; elle est favorisée par le glucose qui entraîne l'apparition d'un voile à la surface du milieu de culture. Il n'y a pas formation d'indole à partir du tryptophane, ni d'hydrogène sulfuré à partir des acides aminés soufrés comme la cystéine. Nous avons précisé ce dernier point en employant le milieu synthétique gélosé de composition suivante [Vaughn et Levine (1936)] :

Chlorhydrate de cystéine	0,250
Agar	1,250
K ₂ HPO ₄	0,075
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,075
CaCl ₂	0,050
Eau bidistillée	250 ml

Ce milieu est stérilisé par 3 chauffages à 100° à vingt-quatre heures d'intervalle et réparti en culot à raison de 5 ml par tube. On y ajoute avant refroidissement du sous-acétate de plomb comme indicateur de réaction. Aucune des 25 souches de bacilles de Whitmore, ensemencées par piqûre, n'a produit le noircissement caractéristique du dégagement d'hydrogène sulfuré.

L'hydrolyse de l'urée et son utilisation comme source de carbone et d'azote, ou d'azote seulement, est un caractère d'identification important. Nous l'avons étudié comparativement sur les milieux classiques de Fergusson-Hook et de Christensen tels qu'ils sont donnés par Dumas (1951), et sur les milieux de Lévy-Bruhl et Cado (1937) dont la composition est la suivante :

Milieu I :

Urée	6
PO ₄ H ₂ K ₂	4
ClNa	5
SO ₄ Mg	0,2
Eau bidistillée	1 000 ml

Milieu II :

Urée	3
PO ₄ H ₂ K ₂	4
CINa	5
SO ₄ Mg	0,2
Glucose	1
Eau bidistillée	1 000 ml

Le pH est ajusté à 7,5 par adjonction de soude et la stérilisation assurée par trois chauffages à 100°.

Nous n'avons obtenu aucune culture avec le milieu I de L-B et C, ni avec le milieu de Fergusson-Hook. Par contre le milieu II de L-B et C donne avec les 25 souches étudiées un croît microbien moyen avec formation d'un voile.

La mesure du pH, effectuée après vingt-quatre heures, après cinq jours et après huit jours, montre une acidification initiale, suivie d'une nette alcalinisation du milieu. Celle-ci est d'autant plus marquée que les souches donnent un dépôt muqueux plus abondant.

Toutes ces souches cultivent également sur le milieu synthétique à l'urée de Christensen. Effectuant des lectures au bout de vingt-quatre et au bout de quarante-huit heures, nous avons note un virage au rouge pour 17 d'entre elles, au jaune pour 2 et pas de modification de la teinte du milieu pour 6.

Malleomyces pseudo-mallei est donc capable d'utiliser l'urée comme source d'azote associée à un sucre.

b) MÉTABOLISME CARBONÉ. — Le sulfate d'ammonium étant choisi comme élément azoté, nous ajoutons 1,50 g des différents composés organiques dont nous voulons déterminer l'utilisation comme source de carbone à :

Sulfate d'ammonium	1,50 g
Milieu de Lwoff	1 000 ml

Utilisation des carbonates et des oxalates. — Le carbonate de Na et l'oxalate de Na ne sont utilisés par aucune souche de bacille de Whitmore.

Utilisation des acétates. — Les 25 souches de bacille de Whitmore étudiées utilisent le carbone de l'acétate de sodium en donnant une culture d'abondance moyenne avec voile.

L'acétate d'ammonium seul assure à la fois la nutrition carbonée et azotée de *Malleomyces pseudo-mallei*, dont la croissance dans ces conditions est cependant lente et demande un inoculum plus important (une goutte au lieu d'une öse) dans le milieu suivant :

Acétate d'ammonium	5 g
Milieu de Lwoff	1 000 ml

dont le pH est de 7,2.

Utilisation des citrates. — L'utilisation du carbone du citrate de sodium est un test de grand intérêt qui est à la base de deux milieux différentiels, le milieu de Koser et le milieu de Simmons [*Cf. Dumas (1951)*].

Dans ces milieux nous avons constaté un développement rapide et abondant des cultures du bacille de Whitmore, fait déjà signalé par de Lajudie et Brygoo (*loc. cit.*).

Utilisation de l'alcool éthylique et de l'alcool méthylique. — Ces deux alcools n'assurent pas le métabolisme carboné du bacille de Whitmore, qui ne donne pas de culture dans le milieu synthétique proposé par Lwoff [*Cf. Dumas (1951)*] pour les *Moraxella*, milieu dont la formule est la suivante :

PO ₄ KH ₂	4,5 g
SO ₄ (NH ₄) ₂	0,75 g
KCl	0,5 g
SO ₄ Mg	0,05 g
Eau bidistillée.	1 000 ml

après stérilisation on ajoute :

Citrate de fer	0,01
CaCl ₂	0,01
Alcool éthylique ou méthylique.	10 ml

CONCLUSION.

L'étude du métabolisme carboné et azoté de *Malleomyces pseudo-mallei* permet de mettre en évidence quelques caractères d'identification de ce microorganisme et de le classer dans la gamme très étendue du monde bactérien étudié du point de vue du pouvoir de synthèse.

Nous avons retrouvé des caractères biochimiques classiques tels que l'utilisation du carbone du citrate de sodium, l'absence de production d'indole à partir du tryptophane et l'absence de production d'hydrogène sulfuré à partir d'acides aminés soufrés comme la cystéine.

Nous en décrivons un nouveau : l'utilisation de l'urée comme source d'azote en présence d'un glucide.

Capable de faire la synthèse de tous ses « métabolites essentiels » à partir d'azote ammoniacal en présence de carbone organique, le bacille de Whitmore peut être classé, dans la nomenclature de Lwoff, parmi les germes mésotropes, immédiatement après les fixateurs d'azote.

Il se montre donc beaucoup moins exigeant que la plupart des germes pathogènes dont la croissance nécessite en général la présence d'acides aminés.

Cette notion vient à l'appui de la théorie selon laquelle le bacille de Whitmore serait largement répandu dans la nature

comme semblent l'indiquer, d'autre part, l'origine tellurique de plusieurs cas de mélioidose et les expériences de Vauzel (1937).

Il faut cependant souligner que, jusqu'à présent, *Malleomyces pseudo-mallei*, au moins sous sa forme classique, n'a jamais été isolé en dehors de circonstances pathologiques.

RÉSUMÉ.

Nous avons étudié en milieux synthétiques le métabolisme azoté et carboné de 25 souches de bactérie de Whitmore.

Cette bactérie s'est révélée capable d'utiliser l'urée comme source d'azote en présence d'un sucre et de faire la synthèse des éléments indispensables à sa nutrition à partir d'azote ammoniacal et de carbone organique.

Il s'agit donc d'un germe mésotrophe qu'on doit s'attendre à trouver largement répandu dans la nature.

BIBLIOGRAPHIE

- P. DE LAJUDIE et E. R. BRYGOO. Ces *Annales*, 1953, **84**, 509.
J. DUMAS. *Bactériologie Médicale*, Flammarion, édit., 1951.
M. LÉVY-BRÜHL et Y. CADO. Ces *Annales*, 1937, **58**, 498.
M. VAUCEL. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1937, **30**, 10.
R. VAUGHN et M. LEVINE. *J. Bact.*, 1936, **32**, 65.

PRÉPARATION D'UN SILICO-GEL ENSEMENÇABLE EN SURFACE ET EN PROFONDEUR

par J. AUGIER (*).

(*Institut Pasteur. Service de Microbie technique.
Laboratoire de Microbiologie du Sol.*)

PRINCIPE.

Un sol d'acide silicique obtenu par passage d'une solution de silicate de Na dans une colonne de permutite possède un pH de 3, reste liquide quasi indéfiniment et se laisse stériliser à l'autoclave. L'addition d'électrolyte permet sa transformation en gel dans une zone de pH comprise entre 3 et 8 environ. Le temps de prise dépend du pH, de la température, de la concentration en sel et en acide silicique.

Il est donc possible d'utiliser un tel sol pour préparer des milieux de composition parfaitement définie qui seront ensemencables soit dans la masse par incorporation de la semence au milieu salin, soit en surface par les méthodes habituelles.

MODE OPÉRATOIRE.

1^o DÉTERMINATION DES CARACTÉRISTIQUES DE LA COLONNE DE PERMUTITE. — Prendre un tube de verre de 30 mm de diamètre et 750 mm de haut ; fermer son extrémité inférieure par un bouchon de caoutchouc à un trou, portant un tube prolongé d'un tuyau de caoutchouc muni d'une pince de Mohr et d'une effilure de verre. Tasser dans le fond de la colonne un peu de coton de verre.

Remplir la colonne d'un volume V d'eau distillée ; faire un repère. Introduire sur une hauteur de 25 cm la permutite C 50 D (1) au préalable imprégnée d'eau distillée pendant vingt-quatre heures et bien essorée sur Buchner. Le niveau de l'eau dans la colonne se sera élevé. Laisser écouler l'eau jusqu'au repère, mesurer son volume V 1 représentant l'eau déplacée par la permutite. Jeter cette eau, laisser écouler de nouveau jusqu'à affleurement de la

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 mars 1954.

(1) Nous avons utilisé la résine fournie par Philipps et Pain.

permutite, mesurer le volume écoulé V 2 correspondant à l'eau qui était au-dessus de la permutite.

Dès lors on a :

$V - V_2 = V_3$ = volume occupé par la permutite.

$V_3 - V_1 = V_4$ = eau d'inhibition de la permutite.

V_4 , très important à connaître, est caractéristique de la colonne : c'est le volume de liquide à éliminer au début de chaque opération. Il représente l'eau d'inhibition de la permutite et ne contient pas encore l'acide silicique qui ne s'écoulera qu'après l'élimination de cette eau.

Exemple numérique pour une hauteur d'environ 35 cm de permutite :

$V = 600 \text{ ml}$; $V_1 = 170 \text{ ml}$; $V_2 = 300 \text{ ml}$ d'air.

$V_3 = 600 - 300 = 300$.

$V_4 = 300 - 170 = 130$.

On a :

Volume de la permutite = 300 ml.

Volume d'écoulement = 130 ml.

Donc, au début de chaque filtration on recueillera à part les 130 premiers millilitres.

2° MISE EN CYCLE HYDROGÈNE OU RÉGÉNÉRATION DE LA PERMUTITE.

— Introduire 300 ml d'acide chlorhydrique au 1/3 (en volume) dans la colonne et laisser écouler 130 ml. Après dix minutes de contact, amener le niveau de l'acide jusqu'à affleurement à la surface de la permutite et maintenir le contact trente minutes. Il se produit une contraction de la permutite. Laver, d'abord par petites fractions ensuite plus abondamment avec 1 l d'eau distillée. A la fin l'eau doit sortir faiblement acide et ne doit plus contenir de chlore. Au cours de ce lavage on voit la permutite se redilater.

Avant chaque usage il faut régénérer la permutite comme ci-dessus.

Lorsque la colonne a servi trois ou quatre fois, la remplir aux 3/4 d'eau distillée et la renverser plusieurs fois de manière à émulsionner la permutite dans l'eau. Remettre vertical et laisser les grains de permutite se sédimentier. Avant que ne soit déposée la substance blanchâtre que contient l'eau surnageante, jeter cette eau pour éliminer le plus complètement possible ce précipité.

Cette opération évite de laisser la colonne se colmater. Ce précipité est du silico-gel qui s'était formé autour des grains de permutite.

Lorsque la colonne a servi dix ou quinze fois, la vider et laver très abondamment la permutite avec de l'eau distillée pour éliminer le silico-gel. On procède comme ci-dessus par décantations successives mais dans un large récipient.

3^o PRÉPARATION DU SOL D'ACIDE SILICIQUE. — Préparer une solution de silicate de sodium au quart en volume, à partir du silicate pur $d = 1,33$ (2).

En verser 250 ml dans une colonne de permutite correspondant à l'exemple numérique ci-dessus.

On commencera par recueillir à part les 130 premiers millilitres (volume d'écoulement de la colonne décrite plus haut).

Dans un deuxième récipient, laisser couler jusqu'à ce que le niveau de silicate arrive à affleurement de la permutite ; verser sur la colonne les 130 ml recueillis au début et laisser de nouveau couler dans le même récipient jusqu'à affleurement. Cette dernière fraction représente le sol d'acide silicique cherché, soit 250 ml environ.

Refaire un deuxième passage avec le sol ainsi préparé comme s'il s'agissait de la solution de silicate de sodium sur la même ou mieux, sur une deuxième colonne.

Le sol final possède une densité voisine de 1,030. Par dilution avec de l'eau distillée on l'amènera à la densité de 1,024.

Faire passer dans la colonne de l'eau distillée pour la débarrasser le plus possible du sol qui peut y rester et qui tend à la colmater.

Nous conseillons de régénérer la permutite immédiatement après usage.

4^o STÉRILISATION. — En règle générale il suffira de répartir en quantité connue dans des fioles stériles de Pyrex le sol précédemment obtenu, de le porter dans un autoclave, déjà chaud, à 110° pendant vingt minutes et de le conserver en glacière. Il restera ainsi utilisable huit jours environ.

Si l'on désire obtenir un sol plus stable et conservant mieux ses propriétés gélifiantes, on pourra l'additionner avant stérilisation de 0,5 ml p. 100 d'acide chlorhydrique normal.

5^o NEUTRALISATION DU SOL. — Dans la plupart des cas, il faut 0,2 ml de NaOH N pour 25 ml de sol de densité 1,024. Mais la mesure de la densité n'est pas suffisamment précise pour déterminer par avance la quantité exacte de soude nécessaire. Il faudra donc vérifier le pH au bleu de bromothyl et corriger s'il y a lieu. La correction est généralement petite : il est rare qu'il faille ajouter plus de 0,1 à 0,2 ml de NaOH pour 100 cm³ de sol.

Pour les sols additionnés d'acide chlorhydrique il faudra ajouter 0,5 ml p. 100 de solution alcaline normale. Il semble préférable dans ce cas de neutraliser à la potasse pour éviter d'introduire trop d'ions sodium.

(2) Nous avons utilisé le silicate pur de chez Prolabo ($d : 1,33$).

UTILISATION DU SILICO-GEL.

PRINCIPE GÉNÉRAL. — A partir d'un sol stérilisé à concentration convenable et amené à neutralité, il est possible de préparer un gel par addition d'une solution saline stérile contenant les principes nutritifs nécessaires et additionnée ou non de la suspension des germes à cultiver. Le mélange sera fait stérilement dans des tubes également stériles. On retournera trois ou quatre fois le tube pour bien mélanger les deux solutions. A partir de ce moment, la viscosité augmente rapidement et il faudra répartir en boîtes de Petri de 5 cm de diamètre en moins de cinq minutes. Un aide est généralement nécessaire pour effectuer cette opération.

Au préalable il faudra avoir déterminé la proportion optimum de chacune des deux solutions pour avoir un gel de consistance convenable. Pour le sol de densité 1,024 les volumes respectifs du sol et de la solution saline peuvent être assez variables selon le milieu de culture choisi. Il faut donc faire le titrage de cette proportion.

TITRAGE DE LA CONCENTRATION OPTIMUM DU SOL. — 1^o Préparer le milieu de culture choisi à quadruple concentration à pH 7,2.

2^o Neutraliser 50 cm³ de silico-gel préalablement stérilisé.

3^o Réaliser la gamme des mélanges suivants :

Silico-gel.	6	5	4	3	2
Eau distillée.	0	1	2	3	4
Milieu 4× concentré.	2	2	2	2	2

Bien mélanger et répartir dans des boîtes de Petri de 5 cm de diamètre.

Laisser au repos jusqu'au lendemain.

Apprécier dans quelle boîte la consistance est convenable. C'est généralement la proportion 4 — 2 — 2 qui est la meilleure.

ENSEMENCEMENT DANS LA MASSE.

Préparer : 1^o Une gamme de dilution de la semence à isoler ou à numériser.

2^o Un sol stérile $d = 1,024$, le neutraliser.

3^o Le milieu de culture à concentration convenable.

Ensuite mélanger la semence au milieu de culture et introduire le sol à la concentration déterminée par le titrage ci-dessus. Bien mélanger et couler en boîte de Petri de 5 cm de diamètre. Laisser au repos quelques heures et porter à l'étuve couvercle en haut, à 26° pour les germes du sol, à 37° pour les germes ordinaires.

ENSEMENCEMENT EN SURFACE.

Procéder exactement comme ci-dessus sans introduire les germes dans le milieu de culture mais en ensemencant en surface.

Pour les germes du sol on a souvent intérêt à « émailler » la surface du milieu. Dans ce cas verser à la surface de la boîte 0,5 cm³ d'une suspension stérile très concentrée de carbonate de Ca (2 parties d'eau pour 1 partie en poids de carbonate de Ca ; bien mélanger au mortier et stériliser). A l'aide de petites oscillations, on répartit le carbonate sur toute la surface. Laisser sécher à l'étuve à 37°-40° (environ vingt-quatre heures) boîte fermée.

Ensemencer selon les méthodes habituelles.

On peut également couler en tubes de 17, inclinés ou non, etc., et se servir de ce milieu comme d'un milieu gélosé.

Ce support convient pour tous les germes et surtout pour les germes de la terre.

CONCLUSION.

La complexité de la préparation de ces gels n'est qu'apparente. Une fois la colonne montée et le titrage fait, la préparation des milieux aux gels de silice ne demande pas plus de temps que ceux à la gélose.

Ce support de silice est en outre absolument inerte, inattaquable par les germes et surtout ne présente aucun pouvoir empêchant, avantage très important ; la gélose se montre en effet souvent toxique pour certains germes.

En outre, le silico-gel n'a pas l'inconvénient de pouvoir jouer comme la gélose un rôle d'haptène polysaccharidique, lors des extractions faites à partir de bactéries cultivées en vue d'une étude antigénique.

Enfin, ces gels de silice sont absolument transparents ; ils permettent d'apprécier bien plus facilement qu'en gélose, les zones d'attaque entourant les colonies de cellulolytiques par exemple. Par contre, la diffusion des enzymes en silico-gel est plus faible qu'en gélose aussi peut-il arriver que la croissance de certains germes soit un peu plus tardive.

BIBLIOGRAPHIE

- S. WINOGRADSKY. Ces *Annales*, 1891, **5**, 92.
C. B. TAYLOR. *J. gen. Microb.*, 1950, **4**, 235.
W. K. SMITH. *Proceed. Soc. appl. Bact.*, 1951, **14**, 139.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 1^{er} Avril 1954.

Présidence de M. PRÉVOT.

NÉCROLOGIE

MAXIME STIASSNIE

(1890-1954)

La disparition de Maxime Stiassnie sera vivement ressentie par tous les microscopistes qui ont eu le privilège de converser avec cet homme courtois et bienveillant dont la compétence était universellement reconnue.

Ancien élève de l'Ecole Polytechnique, où il était entré en 1910, il se trouve engagé dans la guerre comme officier d'artillerie presque aussitôt après sa sortie de l'Ecole. Il est deux fois blessé, en septembre 1914 et octobre 1916 (Croix de guerre, Légion d'Honneur). Après une année passée à l'Institut d'Optique, en 1921, il succède à son père, à la tête d'une maison déjà réputée. On lui doit alors la création de différents modèles de microscopes qui ont fait leurs preuves : modèle de l'Institut Pasteur ; modèle spécial pour les travaux dans les territoires d'Outre-Mer, utilisé en particulier par le Dr Jamot dans ses études en brousse sur la maladie du sommeil ; modèle pliant de voyage ; enfin, grand modèle binoculaire.

Mobilisé en 1939, il est affecté au Service de l'Armement, et, en 1940, refusant de collaborer, il voit son usine fermée, ses machines enlevées, son personnel dispersé. Pendant quatre ans toutes ses fabrications furent arrêtées.

En 1944, il reprend sa tâche avec un outillage de fortune, commence une série de fabrications d'appareils d'optique spéciaux, destinés à l'identification et à la recherche des armes employées clandestinement après le départ des Allemands, contre les Alliés et la population civile. L'autorité militaire américaine lui décerne à cette occasion un diplôme élogieux. Puis l'usine retrouve son activité normale. Tous ses ouvriers rentrent sans exception. C'est sans aucun doute parce que

M. Stiassnie avait vis-à-vis d'eux un comportement très généreux. Les gens qui l'assistaient nous ont dit combien leur patron était profondément humain. Aussi il a toujours été fidèlement entouré d'un noyau d'ouvriers anciens, de techniciens éprouvés qui s'attachaient tout naturellement à leur travail avec le souci de la perfection.

M. Stiassnie n'hésitait pas à se mêler aux siens pour travailler avec eux. Il faisait bien tout ce qu'il faisait et ne laissait à personne d'autre qu'à lui-même le soin de vérifier scrupuleusement l'appareil terminé.

Cette conception un peu artisanale de son métier lui a donné des résultats d'une qualité indiscutable.

J'ai eu parfois la chance de profiter de ses conseils et je lui dois de véritables leçons de technologie microscopique. Je ne voudrais citer qu'un trait de son caractère : je l'ai vu examiner à plusieurs reprises des instruments autres que les siens ; le statif, l'optique faisaient alors l'objet d'une critique minutieuse, mais il commençait toujours par dire tout ce qu'il trouvait *bien*.

Je suis sûr d'être l'interprète d'un grand nombre de biologistes, en rendant hommage à sa mémoire en témoignage de reconnaissance pour les éminents services qu'il a rendus à la microscopie tout entière.

P. M.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine : J'ai l'honneur de présenter à la Société le livre qu'avec mon collègue et ami R. Sohier nous avons consacré aux techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus (1).

Les progrès accomplis depuis quelques années dans les connaissances sur les virus ont permis d'étendre considérablement les moyens d'investigation et de diagnostic, et d'éviter, grâce aux nouvelles méthodes biologiques, des erreurs aux conséquences parfois graves.

En particulier, les méthodes d'isolement et de culture des virus, la préparation d'antigènes spécifiques permettent aujourd'hui d'appliquer aux maladies à virus de l'homme, des procédés diagnostiques qui, dans leur essence, ne diffèrent pas fondamentalement des méthodes couramment employées pour le diagnostic des infections causées par des bactéries.

Nombre de ces techniques mises au point depuis peu mettent à la portée de la plupart des laboratoires convenablement équipés et entraînés la possibilité d'un diagnostic à la fois précoce et précis.

C'est le but de cet ouvrage, qui s'adresse aux cliniciens et aux travailleurs de laboratoire, de les aider dans ces recherches et examens. Il leur présente les techniques relatives à l'isolement des virus, la mise en évidence des anticorps spécifiques ou éventuellement certaines réactions cutanées.

(1) P. Lépine et R. Sohier. *Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus*, Masson et Cie, éditeurs, Paris, 1954, 479 pages, prix : 2 400 fr. broché ; 3 000 fr. relié.

Les biologistes y trouveront le détail des méthodes de laboratoire avec toutes les indications relatives à la mise en œuvre. Les cliniciens pourront s'y reporter pour connaître les conditions dans lesquelles on peut faire appel aux techniques biologiques, grâce à un court rappel clinique précédant chacun des chapitres, les conditions dans lesquelles ils devront effectuer les prélèvements et les faire parvenir au laboratoire, enfin les modalités d'interprétation des résultats qui leur seront donnés.

Essentiellement consacré aux techniques de diagnostic, l'ouvrage décrit les méthodes de laboratoire, mais laisse de côté toute étude théorique ou didactique des virus. Parmi les techniques modernes, il s'attache plus particulièrement à celles qui ont été choisies pour leur rigueur et leur clarté comme pour leur commodité pratique d'exécution.

Nous espérons que ce livre sera de quelque utilité aux laboratoires chaque jour plus nombreux qui ont à envisager sous l'angle pratique le diagnostic des maladies à virus de l'homme.

COMMUNICATIONS

NOUVELLES OBSERVATIONS SUR LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA NATURE DES « BÉCÈGITES »

par PAUL HAUDUROY et WILLY ROSSET.

(*Institut d'Hygiène, Lausanne.*)

Nous avons publié en 1952 les premiers résultats d'inoculations faites parallèlement au cobaye et au hamster de pus de « bécégité » et nous avons pu prouver ainsi que le bacille tuberculeux n'était jamais en cause. En effet, le cobaye survit toujours aux inoculations ; le hamster, par contre, meurt régulièrement d'une infection due au BCG (1, 2).

Nous avons continué systématiquement ces recherches et avons réuni les dix observations suivantes.

Ba..., 4 ans. N° 30872. — Produit examiné : pus. Présence de b. aar. Cultures positives. Cobaye inoculé le 19 février 1952. Sacrifié après dix mois : pas de lésions. Hamster inoculé avec culture le 11 mai 1952. Mort après sept mois : lésions + + +.

Gu..., 21 ans. N° 39538. — Produit examiné : pus. Présence de b. aar. Cultures positives. Cobaye inoculé le 15 octobre 1952. Sacrifié après huit mois et demi : pas de lésions. Hamster inoculé le 15 octobre 1952. Mort après huit mois : lésions + + +.

Ge..., 17 ans, N° 43804. — Produit examiné : pus. Pas de b. aar. (staphylocoques). Cultures positives. Cobaye n° 1, inoculé le 18 février 1953, avec le pus. Sacrifié après neuf mois : pas de lésions. Cobaye n° 2, inoculé avec culture le 9 avril 1953. Sacrifié après cinq mois : Pas de lésions. Hamster n° 1, inoculé le 18 février 1953, avec le pus. Mort après neuf mois : pas de lésions. Hamster n° 2, inoculé avec culture le 9 avril 1953. Mort après un mois : lésions + + +.

Sch..., 22 ans. N° 45521. — Produit examiné : pus. Présence de b. aar. Cultures positives. Cobaye n° 1, inoculé avec le pus le 30 avril 1953. Sacrifié après sept mois : pas de lésions. Cobaye n° 2, inoculé le 2 juin 1953. Mort après trois semaines : abcès au point d'inoculation, sans autres lésions. Cobaye n° 3, inoculé avec le pus d'abcès du cobaye n° 2, le 25 juin 1953. Sacrifié après quatre mois : pas de lésions. Hamster inoculé avec culture le 2 juin 1953. Mort après quatre mois : lésions + + +.

Bo..., 4 ans. N° 47099. — Produit examiné : pus. Présence de b. aar. Cultures positives. Cobaye inoculé avec le pus le 16 mai 1953. Sacrifié après six mois : pas de lésions. Hamster n° 1, inoculé avec le pus le 16 mai 1953. Mort de maladie intercurrente. Hamster n° 2, inoculé avec culture le 10 juin 1953. Mort après deux mois et demi : lésions + + +.

Bo..., 6 ans. N° 47243. — Produit examiné : pus. Pas de b. aar. Cultures positives (b. aar.). Cobaye n° 1, inoculé avec le pus le 19 mai 1953. Sacrifié après six mois : pas de lésions. Cobaye n° 2, inoculé avec culture le 10 juin 1953. Mort le 23 juin 1953 : abcès au point d'inoculation, sans autres lésions. Cobaye n° 3, inoculé le 25 juin 1953, avec pus d'abcès du cobaye n° 2. Sacrifié après cinq mois : pas de lésions. Hamster n° 1, inoculé avec le pus le 19 mai 1953. Mort après huit mois : lésions + + +. Hamster n° 2, inoculé avec culture le 10 juin 1953. Mort après deux mois : lésions + + +. Hamster n° 3, inoculé avec le pus d'abcès du hamster n° 2, le 25 juin 1953. Mort après six mois : lésions + + +.

Gui... 16 ans. N° 47308. — Produit examiné : pus. Présence de b. aar. Cultures positives. Cobaye n° 1, inoculé avec le pus le 22 mai 1953. Sacrifié après six mois : pas de lésions. Cobaye n° 2, inoculé avec culture le 17 juin 1953. Sacrifié après cinq mois : pas de lésions. Hamster n° 1, inoculé avec le pus le 22 mai 1953 : vit encore. Hamster n° 2, inoculé avec culture le 17 juin 1953. Mort après quatre mois : lésions + + +.

Pe... N° 48188. — Produit examiné : pus. Présence de b. aar. Cultures positives. Cobaye n° 1, inoculé avec le pus le 13 juin 1953. Mort de maladie intercurrente. Cobaye n° 2, inoculé avec culture le 30 juillet 1953. Sacrifié après quatre mois : pas de lésions. Hamster n° 1, inoculé avec le pus le 13 juin 1953. Mort de maladie intercurrente. Hamster n° 2, inoculé avec culture le 30 juillet 1953. Mort après deux mois : lésions + + +.

Che... 3 ans. N° 48824. — Produit examiné : pus. Présence de b. aar. Cultures négatives. Cobaye inoculé avec le pus le 29 juillet 1953. Mort après soixante et onze jours : pas de lésions. Hamster inoculé avec le pus le 29 juillet 1953. Mort après quatre mois et demi : lésions + + +.

Kun... N° 50157. — Produit examiné : pus. Pas de b. aar. Cultures négatives. Cobaye inoculé avec le pus le 31 juillet 1953. Sacrifié après quatre mois : pas de lésions. Hamster inoculé avec le pus le 31 juillet 1953. Mort après deux mois ; lésions + + +.

Ces observations nous permettent donc de confirmer nos premières conclusions ; une inoculation de pus de « bécigite » ou de culture

provenant de ces pus au cobaye et au hamster (*Mesocricetus auratus*) prouve que ces bécigites sont bien dues au bacille de Calmette-Guérin et non à des bacilles tuberculeux.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. HAUDUROY et W. ROSSET. *C. R. Acad. Sci.*, 1951.
- [2] P. HAUDUROY et W. ROSSET. *La Presse Médicale*, 28 juin 1952, 981.

RECHERCHES SUR L'ORGANE GIRATOIRE DE *FUSOCILLUS GIRANS*

par A.-R. PRÉVOT, J. GIUNTINI et H. THOUVENOT.

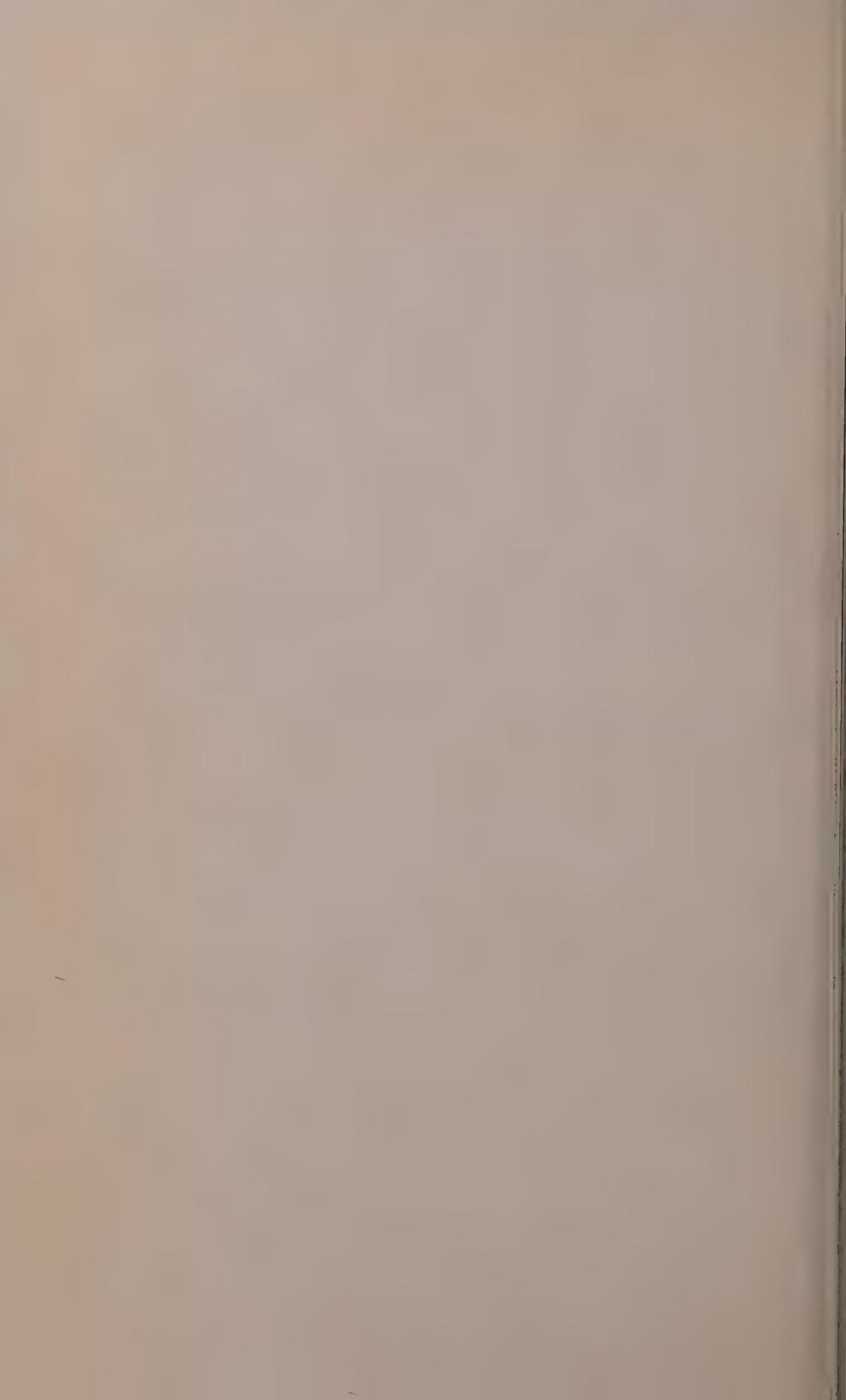
(*Institut Pasteur. Service des Anaérobies.*)

Le caractère le plus frappant de *Fusocillus girans*, celui qui a permis de le distinguer d'emblée des nombreux Fusiformes, est sa mobilité giratoire très spéciale qui a été longuement décrite par l'un de nous en 1940 [1] et qui avait déjà, à cette époque, suscité la recherche de l'organe responsable, cela sans résultat. Aussi avions-nous écrit dans la description morphologique de cette espèce : « Les cils ou flagelles qui sont responsables de cette mobilité doivent être d'une substance très particulière, car nous n'avons pas réussi à les colorer, même en employant les méthodes recommandées pour les anaérobies : acide osmique-argent ammoniacal ; procédé de Casares Gil modifié par Levenson. » D'autres auteurs, après nous, ont également échoué, en particulier W. Kazeef, qui pourtant est un spécialiste de la coloration des cils de Fusiformes [2], à qui nous avions confié nos souches et qui n'a pas pu mettre le moindre cil en évidence (1).

Notre regretté collègue et ami P. Séguin, lui aussi cytologiste spécialisé des Fusiformes, avait également échoué, alors qu'il avait très bien coloré avec H. Boisvert le cil unique de *Fusocillus plauti* et même le cil du granule bactériogène de cette espèce [3]. Quand la microscopie électronique est devenue une méthode courante, nous avons essayé avec O. Croissant de mettre en évidence un appareil moteur qu'aucune coloration ne permettait de voir. Ici encore, nous avons échoué pour une raison très simple que nous n'avons comprise que plusieurs années après, à l'occasion des recherches actuelles faisant l'objet de cette note. Mais avant d'exposer nos résultats, nous devons mentionner le très récent travail de J. B. Mac Donald, M. L. Knoll et R. M. Sutton [4], fait en même temps que le nôtre, mais publié avant

(1) A ce sujet nous faisons remarquer que les Fusiformes dont Kazeef a coloré les cils en 1939 n'appartiennent pas à l'espèce *Fusiformis nucleatus* comme il l'a écrit. Cette dernière espèce est rigoureusement immobile et aciliée. Les cils qu'il a colorés sont ceux d'espèces indéterminées du genre *Fusocillus*, soit *F. shammamei* soit *F. plauti*.





lui et qui a donc incontestablement la priorité : étudiant 5 souches de cet anaérobiose, isolées de la cavité buccale au Canada, ils ont constaté un mouvement giratoire progressif glissant autour d'un pôle fixe, comme nous l'avons décrit en 1940 et qu'on observe très bien à l'ultramicroscope. En contraste de phase, en microscopie électronique, en microscopie polarisée, ces auteurs n'ont pas pu mettre de cil en évidence. Mais en microphotographie électronique par ombrage à l'encre de Chine ou au chrome, ils ont pu déceler une expansion mucilagineuse en deux points diamétralement opposés du bacille, vers ses extrémités. La mobilité n'est pas troublée par l'addition de « tween 80 » au milieu, ni d'alcoylarylsulfonate. Cette mobilité est inhibée en présence d'antisérum spécifiques. Aucune explication n'est donnée par ces auteurs de la mobilité giratoire si spéciale de *Fusocillus girans*.

Nos recherches actuelles datent de la description d'une maladie nouvelle du chat [5] : la fusocillose à grains blancs, qui se présente comme une pseudo-actinomycose où on ne trouve jamais d'*Actinobacterium*, mais toujours *Fusocillus girans*. Un cas récent nous ayant fourni une souche particulièrement mobile, nous l'avons photographiée au microscope électronique. Une première série d'examens a été faite sur des préparations de microbes centrifugés et repris par l'eau bidistillée : on n'aperçoit sur les photographies électroniques ni cil, ni l'expansion mucilagineuse de Mac Donald. Par contre, dans une deuxième série d'examens faits sur la culture totale, après ombrage métallique avec un alliage d'or et de palladium (à 30 p. 100 de Pd), grossissement 15 000, tension d'accélération des électrons 80 000 volts, on peut voir, attachée au corps microbien en position subterminale, une énorme expansion d'une substance amorphe, d'aspect réticulé, rameux, formant un voile mucoïde semblable à celui qui a été décrit par les auteurs canadiens, mais beaucoup plus net et plus visible que sur leurs photographies.

Il est difficile, dans l'état actuel des recherches, d'expliquer comment cet organe peut provoquer la giration de cette espèce. Mais avant de trouver ce mécanisme, il fallait signaler la présence chez une bactérie mobile non ciliée d'un organe encore inconnu et visible seulement en microscopie électronique. Toutefois, nous nous croyons en droit de formuler une hypothèse : cet organe propulserait la bactérie par des ondulations semblables à celles des nageoires monstrueuses de la variété « queue de voile » de *Carassius auratus*. Mais ces ondulations seraient extrêmement rapides et au moment du renversement de la giration, l'expansion mucilagineuse se replierait rapidement à sa base pour propulser le microbe en sens inverse.

Résumé. — *F. girans*, examiné au microscope électronique, n'a pas de cil ni de flagelle, mais une expansion mucilagineuse réticulée subterminale, lysée par l'eau distillée, très visible après ombrage à l'or-palladium. C'est le premier cas de mobilité bactérienne sans cil, expliquable par un organe nouveau, jusqu'ici inconnu.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] A.-R. PRÉVOT. *C. R. Soc. Biol.* 1940, **133**, 246.
- [2] W. KAZEEF. *J. Bact.* 1939, **38**, 103.

- [3] P. SÉGUIN et H. BOISVERT. *C. R. Soc. Biol.* 1942, **136**, 317.
- [4] J. B. MAC DONALD, M. L. KNOLL et R. M. SUTTON. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 1953, **84**, 459.
- [5] A.-R. PRÉVOT, P. GORET, L. JOUBERT, P. TARDIEUX et N. ALADAME. *Ces Annales*, 1951, **81**, 85.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

Fusocillus girans :

Microphotographie électronique de Giuntini.
Gross. : 15 000.

ÉTUDE D'UNE ESPÈCE THERMOPHILE ANAÉROBIE NOUVELLE : *CILLOBACTERIUM THERMOPHILUM* n. sp.

par A.-R. PRÉVOT, H. THOUVENOT, J. PITRE et M. BRESSOU.

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies,
et Laboratoire des Abattoirs de la Villette.)

Dans des conserves de pâté de foie et de pâté de campagne infectés nous avons isolé une espèce thermophile anaérobie nouvelle dont voici la description :

Morphologie. — Bâtonnet de 4 à 5 μ de long sur 0,4 μ de large, droit, isolé ou en très courtes chaînettes ; très lentement mobile ; possédant un cil fin rigide et cassant, non colorable par les méthodes habituelles, mais photographiable au microscope électronique ; parfois bifurqué à une extrémité, asporulé, Gram-positif dans les cultures très jeunes (fig. 1).

Physiologie. — Anaérobie strict, non thermorésistant (1) [tué par un chauffage de dix minutes à 70°], réducteur (rouge neutre réduit définitivement, safranine, temporairement). Longévité supérieure à vingt jours. Thermophile dont l'optimum est à 55° (pousse encore de 45° à 57°). Par adaptation progressive nous avons pu, difficilement d'ailleurs, obtenir une lignée poussant à 37°, mais lentement et très pauvreté, et ne donnant pas tous les caractères culturaux observés à 55°. Cette lignée obtenue à 37°, remise à 55° redevient immédiatement thermophile.

Cultures. — Gazogènes non fétides. En gélose profonde, colonies lenticulaires surtout groupées dans une zone située à 1 cm de la surface libre de la gélose. Peu de gaz. En eau peptonée, pas de culture. En

(1) Cette absence de thermorésistance en culture pure contraste avec une thermorésistance élevée : une heure et demie à 100° dans le pâté où il a été isolé. Il y a donc dans les conserves une substance qui confère la thermorésistance aux bactéries non sporulées.

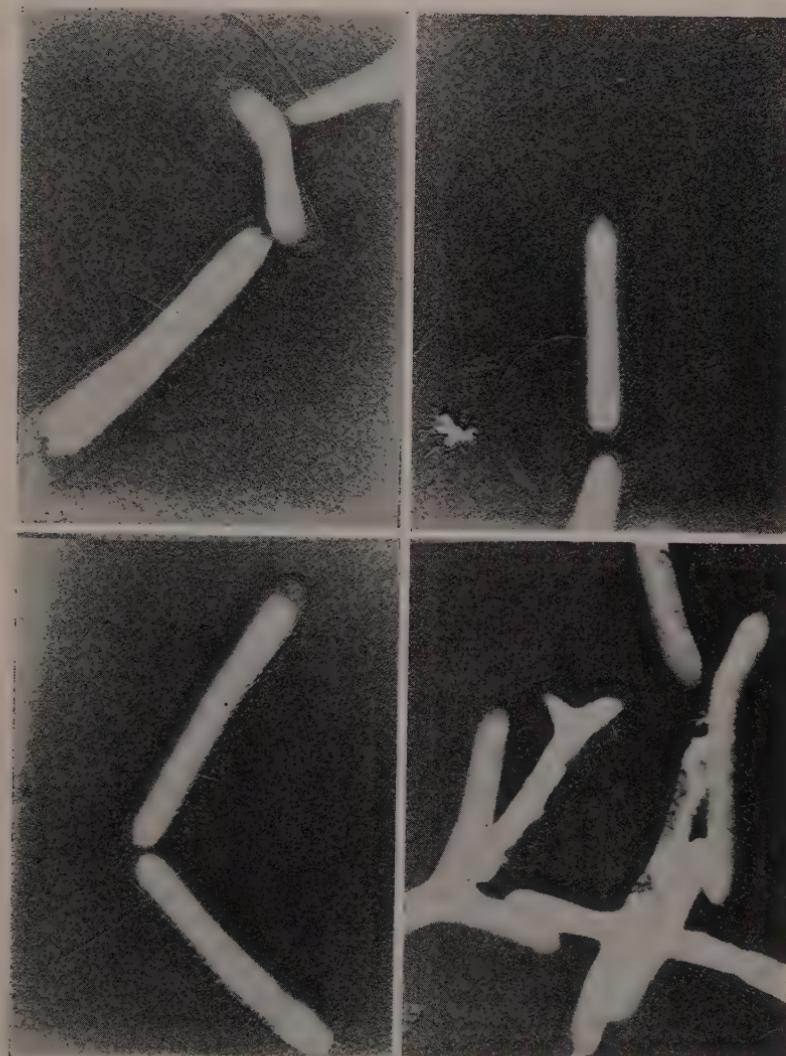


FIG. 4. — *Cillobacterium thermophilum*.
Microphotographie électronique de Giuntini.
Gross. : 15 000

bouillon glucosé, trouble abondant et gaz. La gélatine n'est pas liquéfiée. Le lait est coagulé en quarante-huit heures avec rétraction importante du caillot dans certains tubes, modérée dans d'autres. Les protéines ne sont pas attaquées. Les glucides suivants sont fermentés : glucose, lévulose, maltose, lactose, galactose et amidon.

Caractères biochimiques. — Nitrates non réduits en nitrites. Sulfates et sulfites non réduits en sulfures. Produits de fermentation du bouillon V. F. glucosé : NH_3 : 0,2 g par litre, alcools, trace de SH_2 . A 55°, acides acétique et butyrique (5 pour 1), à 37°, acide acétique pur.

Pouvoir pathogène. — Nul pour le cobaye et la souris.

Position dans le systématique. — Étant un bâtonnet asporulé, cilié et Gram-positif, cette souche appartient au genre *Cillobacterium* Prévet 1938. A l'intérieur de ce genre il fait partie du groupe A (espèces non protéolytiques) comprenant déjà *C. moniliforme*, *C. guinaeensis* et *C. silvestris* [1]. Mais l'ensemble de ses caractères culturaux et biochimiques, et, tout particulièrement, sa thermophilie très élevée, permettent de le différencier de ces espèces et de le considérer comme une espèce nouvelle pour laquelle nous proposons le nom de *Cillobacterium thermophilum*.

Conclusion. — Dans les conserves infectées où on n'a isolé ni souche psychrophile, ni souche mésophile, il faut rechercher les bactéries thermophiles aérobies et anaérobies.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A.-R. PRÉVOT. *Manuel de Classification des Anaérobies*. 2 édit., 1948, 113-114 et 275-276.

ÉTUDE D'UNE SOUCHE DE *CILLOBACTERIUM SPATULIFORME* (DISTASO) P. 1940

par A.-R. PRÉVOT, M. PIÉCHAUD et H. THOUVENOT.

(*Institut Pasteur. Service des Anaérobies.*)

En 1911, au cours de ses recherches sur les anaérobies protéolytiques de la microflore intestinale du chien, Distaso a décrit une espèce sous le nom de *Bacillus tenuis spatuliformis* [1]. Bien que cette description fût très sommaire, Prévet a classé cette espèce dans le genre *Cillobacterium* puisqu'elle est asporulée, mobile et Gram-positive, et pour rendre son nom conforme à la nomenclature binominale, l'a appelée *Cillobacterium spatuliforme* [2]. Il s'agit certainement d'une espèce rare puisqu'elle n'avait jamais été retrouvée depuis sa description. Ayant réussi à en isoler une souche dans le liquide pleural prélevé à l'autopsie d'un cadavre humain (lymphogranulomatose maligne), nous en avons fait une étude qui permettra de compléter le peu qu'on en savait jusqu'ici.

Habitat. — En dehors de l'habitat intestinal du chien invoqué par Distaso, nous pouvons maintenant penser que cette espèce habite l'intestin humain, car sa présence dans la plèvre du cadavre où elle a été isolée s'explique par une infection post-mortem par germe intestinal.

Morphologie. — Il s'agit d'un gros bâtonnet à extrémités carrées, lentement mobile, non sporulé, Gram-positif. Nous avons bien retrouvé les terminaisons élargies en spatules décrites par Distaso. L'élément



FIG. 4. — Appareil nucléaire et ciliature de *Cillobacterium spatuliforme*.

isolé mesure de 2 à 4 μ sur 1 μ à 1,2 μ de large ; les bâtonnets sont parfois réunis 2 à 2 ou 3 par 3 donnant des filaments de 12 μ . Les cils très fins, ondulés, se colorent assez bien par la méthode de Casarès-Gil. Il y en a 3 ou 4, attachés par deux aux extrémités (fig. 1).

En observant des cultures de dix-huit heures, vingt-quatre heures, quarante-huit heures, trois jours et plus, nous avons pu mettre en évidence la formation des spatules et le cycle nucléaire, de même que la production de corps arrondis et ciliés. Les essais de microphotographie de ce cycle n'ayant pas donné de bons résultats, nous avons dessiné une partie de l'aspect très polymorphe du bâtonnet.

Dans les formes jeunes, l'appareil nucléaire est, le plus souvent, constitué par une huitaine de corpuscules en ligne droite médiane, bien colorés par la méthode de Piéchaud (fig 2 : 1). A ce stade on aperçoit non seulement 4 à 5 cils longs et fins colorables par la méthode de Casarès-Gil, mais une très belle capsule. Quand le bâtonnet se divise, vers la dix-huit à vingt-quatrième heure, l'une des deux cellules-filles, alors qu'elle est encore unie à l'autre, s'élargit considérablement (fig. 2 : 2) tout en captant la presque totalité des corpuscules nucléaires qui s'y élargissent (6), donnant des formes en haltère (7), en anneau (8), en diabolo (4) ; à un stade plus avancé (trentième à trente-sixième

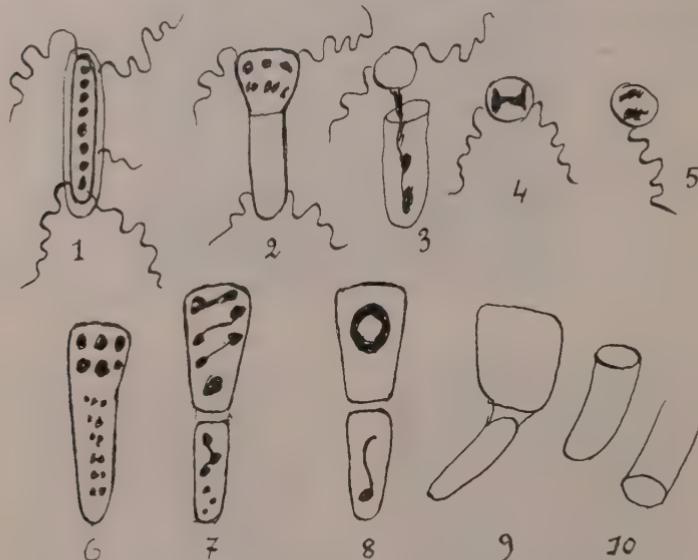


FIG. 2. — Cycle morphologique de *Cilibacterium spatuliforme*.
Microphotographie électronique de Giuntini.
Gross. : 1 000 fois.

heure) la spatule se libère, s'arrondit et s'individualise sous forme d'un corps arrondi de 2 à 3 μ de large, qui possède un ou deux cils (4, 5). Dans certaines préparations nous avons vu cet organite bicilié (3) se libérer de la capsule qui semble ensuite vidée de son contenu (9, 10). L'ensemble de ce cycle comporte des formes étranges dont la plus fréquente est la forme en pipe (fig. 2, 9).

Physiologie. — Anaérobiose strict très réducteur : il fait virer le rouge neutre, la phénosafranine et la safranine irréversiblement. Il n'a aucune thermorésistance (tué à 60°). Il vit plus d'un mois sans repiquage.

Cultures. — Gazogènes et légèrement fétides (odeur de fromage fermenté). Ses colonies en gélose profonde sont irrégulières, globuleuses, translucides, gazogènes. Il trouble abondamment le bouillon

V.F. glucosé en donnant beaucoup de gaz et un fort dépôt. La gélatine est liquéfiée en vingt-quatre heures. Le lait est rapidement coagulé avec forte rétraction du caillot et digestion partielle. La fibrine, le sérum coagulé, le blanc d'œuf coagulé ne sont pas attaqués. Parmi les glucides, seuls le glucose et le maltose sont fermentés.

Biochimie. — Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites ; les sulfites ne sont pas réduits en sulfures. Il ne possède ni uréase, ni catalase. Il produit SH₂, NH₃, indole, crésol, éthanol, aldéhydes et amines volatiles. L'acidité finale des bouillons glucosés est de pH 5,5. L'acidité volatile est constituée d'acide acétique pur ; l'acidité fixe, d'acide lactique.

Pouvoir pathogène. — Les cultures ne sont pas pathogènes pour le cobaye ; le liquide surnageant n'est pas toxique pour la souris. Mais il est légèrement hémolytique pour les hématies de moutons.

BIBLIOGRAPHIE

[1] DISTASO. *Centralbl. Bakt.* 1911, **59**, 97.

[2] PRÉVOT. *Manuel de Classification des Anaérobies.* 1948, 2^e édit., 116.

TECHNIQUE DE DÉTERMINATION DE LA SENSIBILITÉ DES BACTÉRIES ANAÉROBIES AUX ANTIBIOTIQUES PAR LA MÉTHODE DES DISQUES

par H. BÉERENS et J. GUILLAUME

(Institut Pasteur de Lille.)

La méthode de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques par dilution en milieu liquide est certainement la plus rationnelle. Elle est malheureusement longue et coûteuse, aussi lui préfère-t-on dans la pratique courante celle des diffusions en milieu solide. Bien que ces dernières techniques soient sujettes à de multiples causes d'erreur, elles sont néanmoins suffisantes pour les besoins de la clinique et couramment utilisées pour les bactéries aérobies.

En ce qui concerne les anaérobies, Chabbert [1] préconise l'utilisation des disques de papier filtre imprégnés de solutions antibiotiques incorporés dans un milieu gélosé ensemencé, coulé dans le couvercle d'une boîte de Petri. L'anaérobiose est obtenue en disposant à la surface du milieu encore liquide le fond de la boîte ; on réalise ainsi une couche de milieu entre deux parois de verre.

Dans la technique que nous proposons, les disques antibiotiques sont disposés dans la masse d'une gélose profonde V.F. préalablement ensemencée et répartie en tubes. La zone d'inhibition est fonction de la sensibilité de la souche ; elle se mesure de part et d'autre du disque

MILIEU. — Nous utilisons le milieu suivant :

Digestion pepsique de viande et de foie (milieu V. F.)	1 000 ml
Sulfate ferreux	0,50 g

ajusté à pH 7,4, précipité à l'autoclave, filtré et réparti à raison de 80 ml par ballon, stérilisé à 115° pendant vingt minutes. Au moment de l'emploi, on fait fondre au bain-marie bouillant et on régénère durant vingt minutes ; on ajoute 1 ml d'une solution de glucose à 16 p. 100, stérilisée par filtration, de manière à obtenir une concentration finale de 2 p. 1 000.

Le pH joue un rôle important. On sait en effet que l'auréomycine et la terramycine peu actives aux pH alcalins, le sont beaucoup plus aux pH acides. L'action est inverse pour la streptomycine. L'addition de glucose après autoclavage a pour but d'obvier à une trop forte diminution du pH, habituelle au cours de ce dernier. Le sulfate ferreux est un agent réducteur minéral qui n'influence pas l'activité antibiotique.

TECHNIQUE. — Le nombre de germes revivifiables ensemencés est de première importance pour les déterminations de sensibilité par la méthode de diffusion en milieu solide. Il est donc recommandé d'effectuer au préalable une mesure du pouvoir proliférant de la souche étudiée.

1^o *Mesure du pouvoir proliférant.* — A partir d'une culture jeune en milieu liquide ou semi-solide, on fait des dilutions de 10 en 10 (10^{-1} à 10^{-7}) en eau salée à 8,5 p. 1 000. Chaque dilution est ensemencée à raison de 0,5 ml en milieu V. F. glucosé solide réparti à raison de 4,5 ml par tube de $18 \times 0,9$ préalablement régénéré et refroidi à 45° C. On obtient ainsi des dilutions finales de 10^{-2} à 10^{-8} . L'ensemencement est homogénéisé à l'aide d'une pipette Pasteur fermée. On refroidit sous un courant d'eau. Après incubation à 37° C pendant le temps nécessaire à l'apparition des colonies, on repère le tube contenant une densité convenable (70 à 100 colonies par cm³ de milieu, soit approximativement 2 cm de la colonne de gélose).

Cette première mesure n'est pas indispensable cependant ; une certaine habitude y supplée rapidement. On peut admettre que la densité optimum est obtenue aux dilutions 10^{-7} - 10^{-8} pour les bactéries sporulées ; 10^{-5} pour les bactéries non sporulées à croissance facile ; 10^{-3} - 10^{-4} pour les souches donnant des cultures pauvres. La culture initiale est conservée, à la température du laboratoire et à l'obscurité, dans des conditions d'anaérobiose suffisante.

2^o *Test de sensibilité aux antibiotiques.* — On réalise les opérations successives suivantes :

a) Ensemencement. — Les 80 ml de milieu V. F. régénéré, glucosé et refroidi à la température de 45° C, sont ensemencés avec une dilution de la culture initiale dont la richesse en bactéries a été déterminée. On inocule 2 ml d'une concentration cent fois supérieure à celle jugée optimum par la numération. Si la mesure du pouvoir proliférant indique une densité de colonies satisfaisante à la dilution de 10^{-8} , par exemple, on inocule 1 ml d'une dilution à 10^{-6} . On agite avec précaution pour éviter toute oxygénéation.

b) On répartit le milieu ensemencé dans 5 tubes de 18 × 12-13 à raison de 10 ml environ par tube. On refroidit immédiatement sous un courant d'eau (fig. 1, 1).

c) On dispose dans chaque tube, à la surface du culot de milieu solidifié, un disque antibiotique [fig. 1, 2] (1).

d) On dépose sur chacun de ces derniers, à la pipette Pasteur, X gouttes de gélose nutritive à 2,5 p. 100 d'agar préalablement fondue au bain-marie bouillant (fig. 1, 3) et refroidie à 80°. Ainsi on fixe le

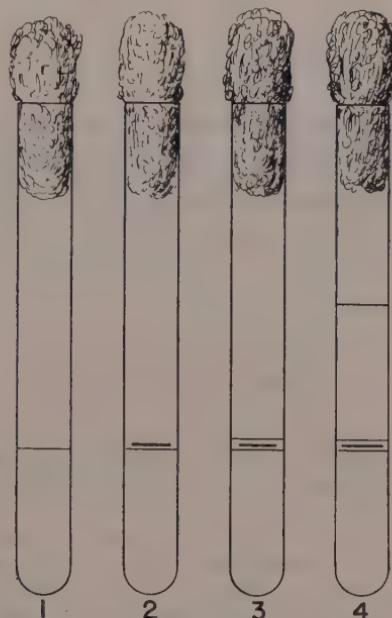


FIG. 1. — 1, Répartir 10 ml de milieu ensemencé; 2, disposer le disque à la surface du culot; 3, recouvrir le disque de gélose nutritive à 2,5 p. 100 d'agar (X gouttes); 4, répartir à nouveau 10 ml de milieu ensemencé.

disque et on évite la dissolution de l'antibiotique lors de la coulée de la seconde fraction de milieu ensemencé.

e) On répartit le reste du ballon, maintenu à 45° lors des opérations précédentes, par quantités sensiblement égales dans chaque tube (fig. 1, 4); on refroidit.

Toutes ces opérations doivent être réalisées dans le délai le plus court possible pour éviter une aération trop forte du milieu et un trop long maintien de la culture à la température de 45°.

f) On incube à 37° : immédiatement dans le cas de bactéries à croissance lente ; après douze heures de séjour à la température du laboratoire dans le cas de bactéries à croissance rapide. Certaines

(1) Nos disques antibiotiques ont été étalonnés avec ceux préparés par l'Institut Pasteur de Paris.

espèces en effet cultivent en deux ou trois heures avant même que la diffusion de l'antibiotique ait eu lieu. La zone d'inhibition se trouve alors réduite par rapport à celle obtenue pour une souche de même sensibilité mais à phase de latence plus longue. L'inverse peut d'ailleurs se constater : dans le cas de souches à phase de latence de longue durée, l'antibiotique a tout le temps de diffuser avant l'apparition de la culture : la zone d'inhibition est ainsi artificiellement augmentée.

g. Dès l'apparition macroscopique des colonies, on mesure la zone d'inhibition située de part et d'autre du disque.

RÉSULTATS. — L'expérience acquise au cours de la détermination de la sensibilité de 200 souches sporulées ou non nous a permis les constatations suivantes :

1^o Cette méthode ne peut être utilisée pour un titrage rigoureux de la sensibilité. Elle autorise néanmoins l'appréciation d'un ordre de grandeur. Nous avons en effet déterminé par des titrages réalisés par dilution en milieu liquide en tube scellé sous vide, un étalonnage de notre procédé suffisant pour les besoins de la clinique. Les interprétations suivantes peuvent être adoptées :

Pénicilline. — Zone inférieure à 15 mm : souche résistante ; zone comprise entre 15 mm et 25 mm : souche à sensibilité douteuse ; zone supérieure à 25 mm : souche sensible.

Auréomycine. — Zone inférieure à 20 mm : souche résistante.

Terramycine. — Zone comprise entre 20 et 30 mm : souche à sensibilité limite.

Chloromycétine. — Zone supérieure à 30 mm : souche sensible.

Nous avons volontairement omis la streptomycine. Elle est peu active sur les bactéries anaérobies. Nous l'avons vérifié par des titrages en eau peptonée à 1 p. 100 (pH 7,2) en tubes scellés sous vide. Les espèces les plus sensibles sont inhibées par des concentrations atteignant 10 µg/ml. De nombreuses autres ne sont sensibles qu'à 40 µg/ml : la plupart tolèrent plus de 100 µg/ml. En outre le milieu V.F. est partiellement inhibiteur de la streptomycine : ceci diminue encore les possibilités de déceler les souches sensibles. Nous signalons toutefois qu'*Actinobacterium liquefaciens* (syn. *Corynebacterium liquefaciens*) est la seule espèce présentant une zone d'inhibition de 50 mm : elle correspond à une sensibilité à 1 µg/ml en milieu V. F. glucosé, liquide, en tubes scellés sous vide.

2^o Les *Ristella* (10 souches) sont les seuls anaérobies que nous avons constamment trouvés résistants à la pénicilline. En milieu liquide, en tubes scellés sous vide, elles cultivent en présence de 10 U. O. par ml. Elles sont néanmoins sensibles aux autres antibiotiques.

Ce fait confirme la gravité, antérieurement constatée, des infections où ces bactéries étaient rencontrées à l'état pur lorsque la pénicilline était le seul antibiotique utilisable en médecine. Nous en connaissons deux cas avec issue fatale : une septicémie et une infection généralisée avec métastases multiples. Lorsque les *Ristella* sont associées à d'autres germes de la flore de Veillon, le problème change d'aspect. Les phénomènes de symbiose ou de saprophytisme fréquemment observés en anaérobiose interviennent. Une bactérie résistante à un antibiotique ne subsiste pas après traitement par cet antibiotique si elle est associée à d'autres bactéries sensibles à ce dernier.

3^e Nous avons constaté que les bactéries anaérobies, sporulées ou non, demeurent dans l'ensemble sensibles aux antibiotiques. L'évolution vers la résistance, bien connue pour les germes aérobies, ne semble donc pas se manifester actuellement pour les anaérobies. Le pouvoir d'adaptation enzymatique est peut-être moins étendu chez eux que chez les premiers.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Y. Chabbert. *Ann. Biol. clin.*, 1951, 9, 544.

SUR UN VIRUS D'ORIGINE MÉNINGITIQUE, APPARENTÉ AU VIRUS D'ARMSTRONG, MAIS ANORMAL PAR SA RÉSISTANCE, SES DIMENSIONS ET SA RÉPARTITION DANS L'ORGANISME

par P. SÉDALLIAN, A. BERTOYE, P. DÉTOLLE, G. LIMET-PILOZ
et J.-P. GARIN.

(Institut Pasteur de Lyon.)

Nous désirons rapporter les caractéristiques d'une souche de chorio-méningite en raison des quelques particularités concernant son origine, sa virulence, et, dans la mesure où nous avons pu l'étudier, son absence d'immunité croisée avec le virus d'Armstrong.

Ce virus a été isolé à six reprises différentes chez le même malade atteint d'une méningite lymphocytaire curable, banale en soi, et dont la courbe fébrile a présenté deux poussées, l'une à 39° du 31 octobre au 6 novembre 1953, l'autre à 38° du 6 novembre au 14 novembre 1953.

La guérison liquidienne était pratiquement confirmée le 23 novembre avec, cependant, persistance d'hyperalbuminorachie isolée à 1 g, tombée à 0,60 g le 20 décembre.

Les souches du virus, identiques par leurs caractères, ont été isolées chez le cobaye par voie péritonéale le 9 novembre à partir du L. C.-R., le 18 novembre à partir du L. C.-R., le 21 décembre à partir du sang et à partir du L. C.-R., le 31 janvier 1954 à partir du sang et à partir des matières fécales du sujet, alors complètement et depuis longtemps guéri de son état méningé.

A partir de leur isolement, toutes ces souches ont subi des passages en série sans que leur virulence se modifie.

Ainsi le malade a eu un L. C.-R. infectant non seulement à la phase aiguë, mais trente-cinq jours après la guérison clinique et liquidienne, soit cinquante et un jours après le début de la maladie. Les recherches n'ont pas été poursuivies au-delà pour le L. C.-R.

Quant au sang du malade, il a été reconnu infectant non seulement trente-cinq jours après la guérison, mais encore soixante-quinze jours

après, quoiqu'à ce moment la virulence ait été nettement atténuée, puisque l'injection à trois cobayes n'a provoqué la fièvre et la mort que chez l'un d'entre eux, de la fièvre pendant trois jours, sans mort de l'animal, chez un autre, et que le troisième est resté indemne. Mais à ce moment le virus s'éliminait par les matières fécales. Il n'y avait pas été recherché antérieurement.

Le malade ayant été le point de départ de ces recherches n'a présenté dans son sang, à plusieurs reprises, aucune réaction sérologique vis-à-vis des bactéries diverses ni des virus suivants : chorioméningite, ornithose-psittacose (antigènes Lederle), ni non plus à l'égard des leptospires, de *Rickettsia burnetii* ou des toxoplasmes. Ses hémocultures ont été constamment négatives.

Chez le cobaye, l'inoculation de ce virus par voies sous-cutanée, intramusculaire et, de préférence, intrapéritonéale, provoque quarante-huit heures après l'inoculation, de la fièvre, en moyenne 40°5. Cette température se maintient en plateau pendant trois à cinq jours, puis l'animal subit une défervescence qui précède la mort de vingt-quatre à quarante-huit heures, celle-ci étant constante et survenant dans des délais s'échelonnant entre sept à douze jours, en général huit jours. L'animal ne présente pas d'autre symptôme qu'un amaigrissement considérable dans les jours qui précèdent la mort. Ses hémocultures restent négatives et l'autopsie ne montre pas d'autres lésions macroscopiques qu'une hypertrophie splénique, d'ailleurs légère, et une fois seulement, des hémorragies sur le péritoine pariétal lombaire. L'étude histologique des tissus des animaux est en cours, ainsi que celle des corpuscules élémentaires sur coupes et frottis.

Dans 11 cas sur 79 animaux examinés, soit 15 p. 100, les animaux ont fait une infection de sortie soit à pneumocoques, soit à *Klebsiella pneumoniae* avec chaque fois, dans ces cas-là, des nodules bronchopulmoniques ou pulmonaires, la mort survenant alors dans les quatre jours suivant l'inoculation.

Le virus se rencontre dans tous les organes du cobaye, il est présent dans le sang le troisième jour après l'inoculation. Le sérum du cobaye, au moment de la crise thermique, est virulent à la dilution de 10⁻⁶ et quelquefois, mais très irrégulièrement, de 10⁻⁸. A des dilutions de cet ordre l'animal ne présente souvent qu'une maladie thermique n'aboutissant pas à la mort, ou dont l'échéance mortelle est retardée au-delà du douzième jour.

Sur la souris, moins sensible que le cobaye, car une proportion importante d'animaux survivent, l'inoculation intracrânienne, moins souvent l'inoculation intrapéritonéale ou sous-cutanée, provoquent le tableau de l'encéphalite conforme à celui que l'on obtient avec le virus d'Armstrong. La souris se met en boule le cinquième ou sixième jour, les crises typiques apparaissent au bout du sixième jour, mais il faut les provoquer en agitant l'animal. La crise se termine dans 50 p. 100 des cas par la mort de l'animal ou bien se reproduit. L'animal meurt avec le dos cassé, comme il est classique.

L'inoculation au lapin par voies intrapéritonéale, intracrânienne et intra-oculaire ne provoque pas de manifestations morbides apparentes, mais le sang devient virulent le cinquième jour et jusqu'au quarante-cinquième jour après l'inoculation. On a constaté l'existence d'un pouvoir neutralisant dans le sérum au-delà de ces délais.

Le hamster et le mérion ne sont pas sensibles, nous n'avons pas recherché l'infection inapparente chez eux.

L'inoculation chorio-allantoïde provoque la mort de l'embryon mais sans qu'il soit noté de modifications macroscopiques de la membrane qui est virulente.

Ce virus est très résistant. Il résiste aux antibiotiques suivants : auréomycine, terramycine, chloramphénicol, streptomycine et pénicilline.

Il résiste au vieillissement et nous avons constaté la virulence de sérums de cobayes conservés plus de huit jours à la température du laboratoire, sans précautions particulières.

Il résiste à la chaleur : plus de deux heures à 50°, plus de quatre heures à 45°, plus de six heures à 37°. Il est tué en cinq minutes à 80° et en une heure par une exposition aux rayons ultra-violets.

Nous n'avons pas pu le neutraliser avec d'autres sérums que celui de lapins ayant fait une infection inapparente. Nous n'avons pas pu le neutraliser en particulier avec un sérum qui nous a été procuré par M. Mollaret et qui provenait d'une chorioméningite authentique.

Avec deux sérums provenant de sujets ayant une réaction de déviation du complément positive avec l'antigène chorioméningitique et chez lesquels nous avons isolé deux virus paraissant beaucoup plus proches du virus d'Armstrong, il n'y a pas eu de neutralisation du virus.

Le sérum du malade, qui était virulent d'ailleurs, n'a pas neutralisé le virus en question.

Ce virus donne des manifestations semblables à celui d'Armstrong, mais se distingue de celui-ci par la négativité de la déviation du complément (à l'aide de l'antigène chorioméningitique) du sérum du malade, par sa résistance au vieillissement et à la chaleur. Il pourrait s'apparenter peut-être au virus décrit par Pellissier et Lumaret [4], isolé dans un ictere, et dont les déterminations pathologiques sont voisines. Cependant, étant donné la source du virus que nous étudions ici, il paraît plus normal d'en faire une variété de virus chorioméningitique.

BIBLIOGRAPHIE

[4] A. PELLISSIER et LUMARET. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1949, **42**, 52.

LA COLORATION SANS HYDROLYSE DU NOYAU DES BACTÉRIES

par M. PIÉCHAUD.

(*Institut Pasteur, Service de Microbiologie générale [Dr DUMAS].*)

Les techniques de coloration les plus courantes à l'heure actuelle pour mettre en évidence les corps nucléaires des bactéries sont dérivées

de la méthode de Feulgen, et comportent par conséquent une hydrolyse acide. Ce traitement chimique peut empêcher toute autre étude, celle des inclusions par exemple, sur la même bactérie. B. Delaporte [4] a cependant attiré l'attention sur la nécessité de ces études pour mieux comprendre la structure de la substance nucléaire et l'influence que peuvent avoir les autres organites présents dans la cellule sur sa forme. La coloration directe des corps nucléaires, sans hydrolyse après fixation, en dehors de son intérêt propre de coloration sans traitement chimique, donne cette latitude. Nous avons montré que la chromatine nucléaire des bactéries [2, 3], comme celle des protozoaires et des métazoaires, peut se colorer en pourpre par un

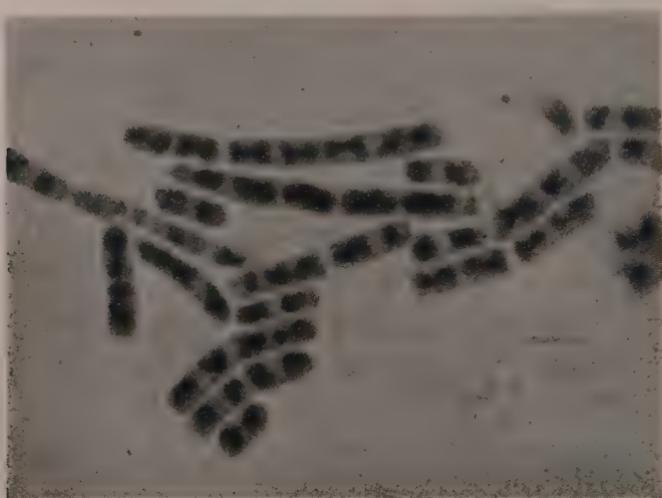


FIG. 1. — *B. cereus*, culture gélose 15 heures : procédé I. Giemsa-éosine.

procédé issu de la méthode de Romanowsky, avec un éosinate de dérivé d'oxydation du bleu de méthylène (azur ou violet). Cette coloration peut être, par son caractère général, considérée comme véritablement spécifique. L'habitude a été prise de se servir du colorant de Giemsa utilisé par les hématologistes et les parasitologistes. En cytologie bactérienne ce colorant, par suite des caractères particuliers du cytoplasme et de la membrane des bactéries, ne permet pas la plupart du temps de mettre en évidence de structure interne. Il ne faut pas oublier qu'il a été composé pour les cellules sanguines. Si l'on revient au principe de la coloration de la chromatine par un éosinate d'azur ou de violet de méthylène, coloration qui ne se produit qu'en présence de bleu de méthylène libre, on s'aperçoit que la chromatine bactérienne se colore avec un excès très faible de bleu de méthylène libre, tandis que la chromatine des leucocytes sanguins ne se colore pas en pourpre dans les mêmes conditions. Pour obtenir cette coloration de la chromatine des leucocytes il faut un excès relativement

bien plus grand de bleu, condition dans laquelle les bactéries colorées en violet ne montrent plus, en général, de structure interne. C'est ce qui explique que le Giemsa, composé avec un excès important de bleu à côté de l'éosinate d'azur, ne convient pas à l'étude des bactéries.

De ce principe, coloration par un éosinate d'azur en présence d'un excès de bleu de méthylène adapté aux bactéries, diverses modalités d'application sont possibles. Des différences qui paraissent tenir au cytoplasme, en particulier à sa plus ou moins grande basophilie, peuvent nécessiter des variations légères de l'excès de bleu de méthylène, différences suivant l'espèce, la souche ou même l'âge de la cul-



FIG. 2. — *Esch. coli*, culture gélose 1 h. 15 : procédé III, azur II-éosine, sol. aq.

ture, mais aussi selon la nature de la fixation qui intervient indirectement en modifiant cette basophilie cytoplasmique. On ne peut donc adopter un taux de bleu de méthylène libre convenant à tous les cas.

La fixation peut être faite à l'état humide aux vapeurs d'acide osmique simplement, ou suivie d'une fixation à l'alcool éthylique, à l'alcool méthylique, à l'alcool à brûler, au sublimé alcoolique de Schaudinn (à condition d'éliminer le sublimé à l'alcool iodé), tous fixateurs qui ne modifient pas profondément le pH, modification à laquelle la coloration est très sensible. C'est pourquoi aussi les lames ou lamelles servant à faire les préparations doivent être très propres (séjour dans l'acide chlorhydrique dilué, rinçage à l'eau et conservation dans l'alcool d'où elles sont retirées et essuyées au moment de l'emploi). Les préparations peuvent être faites par apposition de fragments de gélose, par frottis de fragments de gélose, par étalement de suspensions ou de cultures en milieu liquide, en évitant les accumulations

de germes. La préparation séchée après fixation est immergée quelques secondes dans un récipient contenant de l'eau du robinet.

Les colorants :

1^o Le Giemsa lui-même peut être utilisé. Il contient trop de bleu de méthylène libre ; le bleu sera diminué en le transformant partiellement en éosinate par adjonction d'éosine à l'eau de dilution.

2^o Ou bien à un éosinate dissous dans de l'alcool méthylique glycériné on ajoutera, au moment de la dilution, l'excès nécessaire de bleu de méthylène.

3^o Ou bien encore revenant à la méthode initiale de Romanowsky, on mélangera une solution aqueuse d'azur ou de violet de méthylène à une solution aqueuse d'éosine dans une proportion qui ménage le léger excès de bleu nécessaire.

Par suite de l'influence des divers facteurs que nous avons signalés sur la coloration, il faut pour essayer la technique, s'en tenir aux mêmes conditions de fixation, de lavage, de concentration du colorant, de nature de l'eau de dilution, de façon que seul puisse varier l'excès de bleu de méthylène. Il vaut mieux colorer les lames face en dessous dans le bain. Nous nous servons à cet effet de boîtes de Laveran, dans lesquelles on verse 20 ml de colorant. Nous donnons ici des indications pour ce volume, qui peuvent être adaptées à d'autres conditions.

Techniques :

1^o *Coloration au Giemsa.* — On prépare une solution d'éosine à 0,5 p. 100 dans l'eau distillée. On prend deux tubes à essai. Dans l'un on met un certain nombre de gouttes d'éosine, puis 20 ml d'eau du robinet (pH 7,4 - 7,6 dans notre laboratoire). Dans l'autre, pendant que la préparation séjourne dans l'eau du robinet, on compte XL gouttes de Giemsa. On verse le contenu du premier tube dans le second, on incline deux fois pour mélanger, on verse le tout dans la boîte de Laveran et on y place la lame face en-dessous. Au bout de trois à dix minutes la lame est retirée, lavée à l'eau du robinet et séchée rapidement.

Nous ne pouvons donner que des indications approximatives sur le nombre de gouttes de solution d'éosine, variable surtout selon la marque du Giemsa. Nous avons essayé un Giemsa R. A. L. des Etablissements Kuhlmann courant en France, un Giemsa américain de la National Anilin Division, un Giemsa Geigy suisse. Les deux premiers étaient assez semblables et le nombre de gouttes d'éosine nécessaire était de l'ordre de X (l'éosine était de marque R. A. L. 225 pour histologie). Par contre avec le Giemsa Geigy il en fallait beaucoup moins, entre I et II gouttes, de sorte que dans ce cas, pour plus de commodité, il valait mieux diluer la solution d'éosine au dixième et en mettre alors X gouttes pour un premier essai. Dans ces conditions trois cas peuvent se produire. Ou bien les corps nucléaires sont bien colorés dans un cytoplasme bleu ou violet : la quantité d'éosine est correcte ; on pourra au besoin, en augmentant légèrement cette quantité, avoir un cytoplasme plus clair, en la diminuant l'avoir plus foncé. Ou bien le cytoplasme est seul coloré en bleu pâle, ou même presque invisible, sans corps nucléaires : il faut diminuer la quantité d'éosine. Ou bien tout le corps cellulaire est violet sans structure interne visible : il faut augmenter la quantité d'éosine, car il y a trop de bleu libre.

Cependant un titrage en tubes peut éviter au besoin trop de tâtonnements.

Le plus simple est de le faire dans les conditions d'utilisation. D'une série de dilutions (I, II, V, VII, X, XIII, XV, XVIII et XX gouttes d'éosine à 0,5 p. 100 dans 20 ml d'eau du robinet) on répartit 1 ml dans 9 tubes de Kahn. Puis dans chaque tube on ajoute II gouttes de Giemsa. On agite soigneusement chaque tube, puis on laisse précipiter, en agitant à plusieurs reprises, et on examine la teinte du liquide surnageant au bout de quelques heures ou mieux le lendemain. Les premiers tubes montrent un surnageant bleu, les derniers un surnageant rose vineux. Ceci se verra mieux en inclinant les tubes sur un fond blanc. Le premier tube où la teinte vire au rose est celui du mélange où la saturation du bleu libre est complète, par exemple mélange fait avec XIII gouttes d'éosine pour 20 ml d'eau. On prendra donc comme base pour un premier essai la dilution du tube précédent ; X gouttes d'éosine pour 20 ml d'eau (1).

2^e Coloration avec un éosinate d'azur ou de violet de méthylène. — Nous en avons décrit précédemment la technique [2, 3].

L'éosinate peut être fait avec un azur ou un violet de méthylène à l'ammoniaque selon Tribondeau [4] ou un azur I ou II commercial. Pour préparer l'éosinate, on fait une solution de l'azur ou du violet à 1 p. 100 et une solution d'éosine à 2 p. 1 000 dans l'eau distillée (neutralisée de préférence). Un titrage en tubes permet de trouver les proportions optimum des solutions pour obtenir le précipité : on répartit 0,1 ml de la solution d'azur ou de violet dans 14 tubes de Kahn, puis 0,2 ml de la solution d'éosine dans le premier tube, 0,3 ml dans le second, et ainsi de suite 0,4-0,5 jusqu'à 1,5 ml. On mélange soigneusement et on examine au bout de quelques heures à la lumière du jour la teinte du liquide surnageant au-dessus du précipité. Il est bleu foncé dans les premiers tubes, rose vineux dans les derniers. Choisir les proportions du dernier tube bleu clair, par exemple 0,1 ml d'azur ou de violet pour 0,7 d'éosine. Le mélange des deux solutions est fait dans ces proportions, par exemple 10 ml pour 70 ml, et bien agité. Le lendemain on décante le précipité, on le lave deux ou trois fois par centrifugation avec de l'eau distillée neutralisée et on le redissout dans un volume d'alcool méthylique glyciné à 20 p. 100 égal à trois fois celui de la solution d'azur ou de violet qui a servi à le préparer (30 ml dans l'exemple choisi). On laisse dissoudre jusqu'au lendemain en agitant à plusieurs reprises.

Pour effectuer la coloration, on prend deux tubes à essai. Dans l'un on met IV gouttes d'une solution à 1 p. 100 dans l'alcool éthylique absolu de bleu de méthylène médicinal, puis 20 ml d'eau du robinet. Dans l'autre, pendant que la préparation fixée et séchée séjourne dans de l'eau du robinet, on compte XXXV gouttes d'éosinate. On verse le contenu du premier tube dans le second, on incline deux fois pour assurer le mélange et on verse la solution dans une boîte de Laveran où la lame est placée face en dessous pendant trois à dix minutes, puis rincée à l'eau du robinet et séchée rapidement. On peut être amené à faire varier la quantité de bleu de méthylène. En effet, ou bien

(1) Les gouttes sont comptées à la pipette Pasteur. XL gouttes de Giemsa = 0,5 ml ; XX gouttes d'éosine = 0,6 ml.

les bactéries sont violettes sans ou presque, de structure interne visible : il faut diminuer la quantité de bleu de méthylène. Ou bien les corps nucléaires sont colorés en pourpre et le cytoplasme en bleu plus ou moins foncé : la coloration est correcte, et une légère variation de la quantité de bleu permettra au besoin d'avoir un cytoplasme plus clair ou plus foncé. Ou bien le cytoplasme bleu pâle est seul visible, avec souvent les emplacements nucléaires marqués par des espaces plus clairs : il faut augmenter la quantité de bleu de méthylène. Une fois cette quantité de bleu déterminée, de légères variations pourront être nécessaires avec certaines bactéries ou à certains âges de culture ou enfin pour mieux étudier dans une population microbienne certaines formes tranchant sur l'ensemble par la basophilie de leur cytoplasme.

3^e Coloration avec un mélange extemporané d'azur et d'éosine en solution aqueuse. — Ce procédé ressemble à la méthode de Laveran dérivée directement de la méthode de Romanowsky, mais les proportions sont très différentes et ménagent seulement un très faible excès de bleu. Tronnier [5] proposant cette technique et utilisant un azur I, un bleu de méthylène et une éosine Bayer-Leverkusen, donne des concentrations très précises des solutions. Ces chiffres ne conviennent pas pour des colorants d'autres marques qui peuvent nécessiter des proportions très différentes. On peut d'ailleurs utiliser d'autres colorants, azur I seul ou avec bleu de méthylène, azur II, ou bleu Borrel. C'est pourquoi on est amené à faire encore un titrage en tubes. On prépare du colorant basique choisi, une solution à 1 p. 100 dans l'eau distillée et une solution d'éosine à 2 p. 100. On titre en tube comme pour la préparation d'une éosinate (voir technique précédente). On choisit les proportions du dernier tube dont le surnageant est franchement bleu clair (le suivant étant rose vineux ou lilas). Cette proportion servira de base pour un premier essai.

Coloration : dans un tube à essai on met 0,5 ml de la solution du colorant basique et on complète à 10 ml avec de l'eau du robinet. Dans un autre tube on met un volume de solution d'éosine dans le rapport déterminé par exemple s'il était de 0,1 ml du colorant basique pour 1 ml d'éosine on mettra 5 ml d'éosine) et on complète à 10 ml avec de l'eau du robinet. On verse le contenu du deuxième tube dans le premier, on incline deux fois pour assurer le mélange et on verse dans une boîte de Laveran. Suivant le résultat obtenu, de la même manière que précédemment on pourra être amené à diminuer légèrement la quantité d'éosine si les corps nucléaires ne sont pas ou incomplètement colorés, ou à l'augmenter légèrement si les bactéries sont violettes sans structure interne visible.

Ce rapport des deux colorants ayant été déterminé, on peut, si on préfère, modifier les concentrations des colorants pour les utiliser chacun sous un volume de 10 ml.

Un tel mélange précipite très rapidement, du fait probablement du faible excès de bleu et de l'absence d'alcool et de glycérine. Pour pallier cet inconvénient, nous ajoutons dans le tube de colorant basique I goutte d'une solution visqueuse de gomme arabique (ou même de colle de bureau à la gomme arabique) qui a l'effet général des colloïdes sur la précipitation. Elle la retarde sans gêner la coloration et permet d'utiliser un bain pour plusieurs colorations.

En résumé, en proposant trois techniques de colorations directes, l'une sur le modèle de la méthode de Romanowsky, l'autre utilisant un éosinate en solution alcoolique, la troisième utilisant un Giemsa modifié, nous espérons avoir montré que la coloration directe des corps nucléaires des bactéries est aussi simple que celle des noyaux des leucocytes ou des protozoaires, une fois acquise la notion que la technique, avec ces colorants neutres, doit être adaptée au cas particulier des bactéries.

On peut fort bien imaginer qu'un jour un fabricant livrera un colorant convenant aux bactéries comme le Giemsa convient au sang.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] B. DELAPORTE. *Adv. in Genetics*, 1950, vol. III.
- [2] M. PIÉCHAUD. *Ces Annales*, 1949, **76**, 66.
- [3] M. PIÉCHAUD. *Bull. Micr. appl.*, 1951, 178.
- [4] TRIBONDEAU. *Ces Annales*, 1917, **34**, 412.
- [5] E. A. TRONNIER. *Naturwiss.*, 1953, **40**, 511.

UN NOUVEAU MILIEU DE CULTURE POUR LE DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DU TRYPTOPHANE

par STANIMIR SIBALIC et NADA RADEJ.

(*Institut d'Hygiène. Service de Chimie biologique, Belgrade.*)

Pour le dosage microbiologique des acides aminés, il est indispensable d'utiliser un milieu de culture renfermant tous les facteurs de croissance nécessaires à la prolifération d'un microorganisme : vitamines, hydrates de carbone, sels minéraux et acides aminés, excepté celui que l'on désire déterminer.

Nous avons remplacé, dans un tel milieu de culture, les vitamines rares et coûteuses et les bases puriques, par un extrait provenant de levures de boulangerie. Notre extrait fut obtenu suivant la méthode indiquée dans les *Vitamin Methods* [1].

Pour doser le tryptophane, nous avons employé la méthode de Lyman [2], en remplaçant les vitamines et les bases puriques par notre extrait de levures, exempt de l'acide aminé à doser. Le nouveau milieu de culture fut préparé de la façon suivante.

Dans 400 ml d'eau distillée, on dissout : 5 g de peptone (traitée par H_2O_2), 60 ml d'extrait de levures, 0,1 g de *l*-cystine, 0,1 g de *l*-tyrosine, 0,1 g de *dl*-méthionine, 0,5 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de KH_2PO_4 , 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,01 g de NaCl, 0,01 g de $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$, 0,01 g de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, 20 g de glucose et 16,6 g de $CH_3COONa \cdot 3 H_2O$. On ajuste le pH à 6,8 et on complète le volume à 500 ml avec de l'eau distillée.

L'addition de notre extrait de levures permet donc de remplacer 13 facteurs de croissance variés nécessaires à la prolifération de *Lactobacillus arabinosus*.

PARTIE EXPÉRIMENTALE. — A. Préparation de l'extrait de levures. — 200 g de levures fraîches de boulangerie sont délayées dans 500 ml d'eau distillée [1]. Le pH du milieu est ajusté à 4,5 à l'aide de SO_4H_2 à 10 p. 100. Le mélange, porté à l'autoclave, est maintenu environ deux heures dans la vapeur d'eau de l'autoclave ouvert, puis vingt minutes à 121°. Après refroidissement, on sépare le liquide du résidu par centrifugation (2 000 tours/min.). Dans le surnageant, on détermine le taux de protéines selon la méthode de Kjeldahl. Ce taux

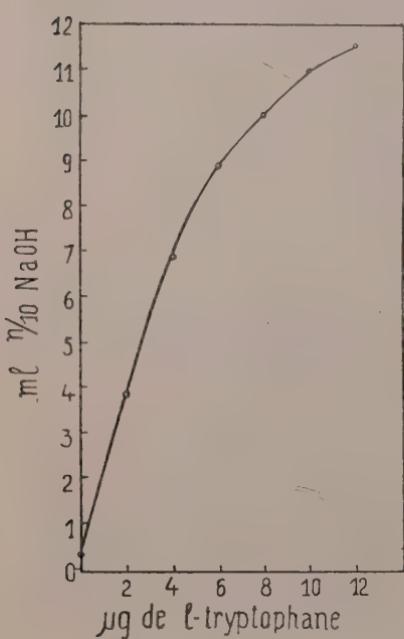


FIG. 1.

FIG. 1. — Courbe témoin (milieu de culture de Lyman) : titrimétrie.

FIG. 2. — Courbe témoin (nouveau milieu de culture) : titrimétrie.

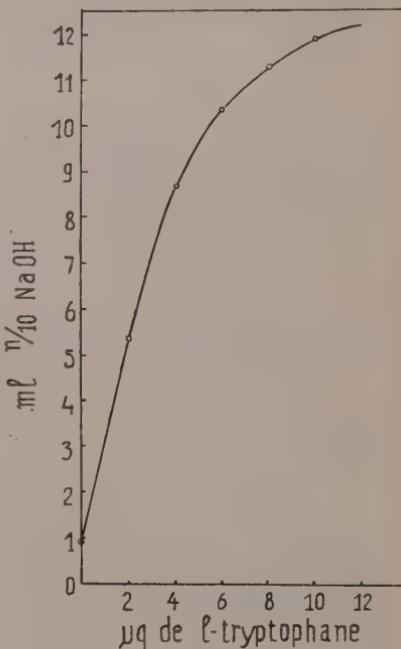


FIG. 2.

s'élève à 1 p. 100 environ. Afin d'éliminer le tryptophane de cet extrait, on ajoute par gramme de protéines, 16 ml de sulfate mercurique à 15 p. 100 en solution dans l'acide sulfurique 7 N. Le mélange ainsi obtenu est laissé une nuit à 4°. Puis, après centrifugation, l'excès de mercure dans le surnageant est éliminé à l'aide du SH_2 . Le sulfite de mercure formé est ensuite séparé par centrifugation. L'acide sulfurique du surnageant est neutralisé avec le $\text{Ca}(\text{OH})_2$ solide en ramenant le pH à 4,5. Le précipité formé est séparé par centrifugation et le pH réajusté à 6,5 à l'aide de la soude N/10. Le SH_2 restant est éliminé par un courant d'air. Le liquide ainsi préparé (500 ml), mis dans un flacon de verre coloré, est additionné de toluène

et se garde à la glacière (4°). Cet extrait est utilisable pendant deux semaines.

B. Dosage du tryptophane à l'aide de *LACTOBACILLUS ARABINOSUS* 17-5 (1).

1^o Préparation des hydrolysats. — Dans un tube en pyrex, on introduit 0,5 g d'échantillon dont le taux en azote total est connu et on ajoute 10 ml d'une solution de soude 5 N. Bouché avec du coton, le tube est mis dans l'autoclave et laissé dix heures à 121° [3]. Après l'hydrolyse, le contenu du tube est transféré dans une ampoule à décanter. On

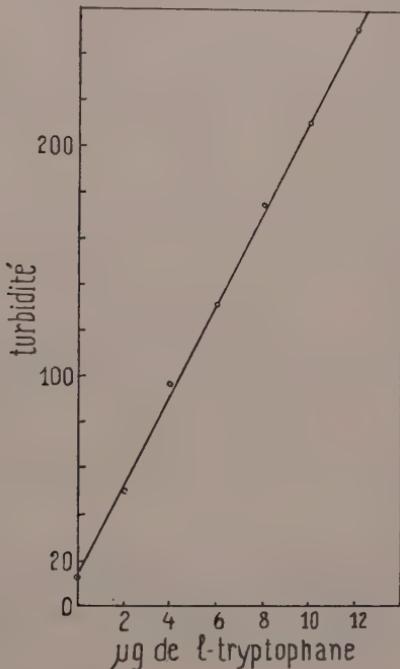


FIG. 3. — Courbe témoin (nouveau milieu de culture) turbidité.

traite deux fois le liquide décanté avec une solution éther-toluène [4]. Le pH de la solution aqueuse est amené à 6,8 avec une solution de soude, le volume est complété à 100 ml, puis on filtre.

2^o Courbes témoin. — Dans des tubes (180 × 20 mm) on introduit (en ayant soin de préparer des doubles) 5 ml de milieu de culture préparé comme nous l'avons indiqué plus haut et, parallèlement, le milieu de culture préparé selon Lyman. Les quantités de L-tryptophane utilisées pour obtenir la courbe témoin varient de 2 à 10 µg. Le volume des tubes est complété à 10 ml avec de l'eau distillée. On stérilise quinze minutes à 121° .

3^o Ensemencement et détermination du taux de tryptophane. —

(1) *Lactobacillus arabinosus* fut entretenue selon la méthode de Sheffner et coll. [5].

Après stérilisation le milieu de culture estensemencé avec une goutte de suspension de *Lactobacillus arabinosus* selon le procédé de Sheffner et ses coll. [5], puis laissé soixante-douze heures à 37°. Les tubes sont ensuite maintenus dix minutes dans l'autoclave ouvert pour arrêter la prolifération bactérienne. On détermine le taux d'acide lactique formé à l'aide d'une solution de soude N/10 par électritrimétrie. On peut encore, dix-huit à vingt-quatre heures plus tard, mesurer la turbidité à l'aide du spectrophotomètre de Beckman sur une longueur d'onde de 660 mμ.

RÉSULTATS. — Nous avons dosé le tryptophane dans les hydrolysats de caséine, de maïs et de haricot, en utilisant notre milieu de culture et celui de Lyman. Les résultats obtenus dans les deux cas concordent parfaitement et représentent la moyenne des résultats obtenus avec des dilutions différentes.

TABLEAU I.

ÉCHANTILLONS	TAUX DE TRYPTOPHANE EXPRIMÉ EN POURCENTAGE		
	Milieu de culture de Lyman	Nouveau milieu de culture	
		Titrimétrie	Turbidité
Caséine	1,17	1,22	1,21
Maïs	0,52	0,55	0,55
Haricot	0,97	0,99	0,99

TABLEAU II. — Résultats obtenus pour quatre expériences

ÉCHANTILLONS	1 ^{re} EXPÉRIENCE		2 ^e EXPÉRIENCE		3 ^e EXPÉRIENCE		4 ^e EXPÉRIENCE	
	Titr.	Turb.	Titr.	Turb.	Titr.	Turb.	Titr.	Turb.
Caséine . .	1,17	1,24	1,24	1,20	1,22	1,22	1,26	1,16
Maïs	0,58	—	0,55	—	0,54	—	0,50	—
Haricot	1,04	—	1,0	—	0,92	—	1,02	—

CONCLUSIONS. — Nous avons proposé un nouveau milieu de culture pour le dosage microbiologique du tryptophane dans les protéines.

Les valeurs obtenues pour le tryptophane dans les hydrolysats de caséine, maïs et haricot, avec le nouveau milieu de culture, corroborent bien celles obtenues avec le milieu de culture de Lyman.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *Vitamin Methods*, vol. I, Acad. Press N.-Y. Publish., 1950.
[2] C. M. LYMAN, O. MOSLEY, S. WOOD et F. HALE. *Arch. Bioch.*, 1946, 40, 427.

- [3] I. STOKES, M. GUNESS, I. DWYER et M. CASWELL. *J. biol. Chem.*, 1945, **160**, 35.
- [4] GREENE et BLACK. *J. biol. Chem.*, 1944, **155**, 1.
- [5] A. L. SHEFFNER, B. J. KIRSNER et W. PALMER. *J. biol. Chem.*, 1948, **175**, 107.

Les communications suivantes paraissent ou paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Activité de la toxine de *W. perfringens*. I. Titrages *in vitro* en présence de sérum humain ou d'émulsion de jaune d'œuf, par M. GUILLAUMIE, A. KREGUER, M. GEOFFROY et G. READE.

Nouvel essai sur la détermination du pouvoir amyloytique des terres, par M. DE BARJAC et M.-A. CHALVIGNAC.

Microméthode de séro-neutralisation de la poliomyélite. Emploi de cultures cellulaires sur plaques moulées de matière plastique, par G. BARSKI et P. LÉPINE.

La fiche réticulo-endothéliale. VI. Le point de vue quantitatif et le problème des sérogrammes, par G. SANDOR, G. LAGRUE et Y. LE BOT.

Concentration de diverses toxines et anatoxines par l'acide métaphosphorique, par A. TURPIN, M. RAYNAUD et E.-H. RELYVELD.

A propos des techniques d'identification des staphylocoques pathogènes par les phages. I. Opérations préliminaires et identification proprement dite. II. Choix d'une méthode de dilution des phages. Etude des fausses réactions produites par les lysats, par R. WAHL et J. FOUACE.

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 86

Notices nécrologiques.

† J. GENEVRAY (1891-1953)	259
† M. STIASSNIE (1890-1954)	770
<hr/>	
AUDEBAUD (G.). — Voir PELLISSIER (A.).	
AUGIER (J.). — Préparation d'un silico-gel ensemencable en surface et en profondeur	765
BALTAZARD (M.). — Voir NÉEL (R.).	
BARBU (E.). — Voir VIGNAIS (P.).	
BARSKI (G.), JEZIERSKI (A.) et LÉPINE (P.). — Sensibilité au virus de la poliomyélite <i>in vitro</i> des tissus de différentes espèces de singes d'Afrique Centrale. Non réceptivité des tissus de certains mammifères	243
— MACDONALD (A.) et SLIZEWICZ (P.). — Conditions de persistance du virus poliomyélitique dans le suc gastrique humain.	579
— et LÉPINE (P.). — Microméthode de séroneutralisation de la poliomyélite. Emploi de cultures cellulaires sur plaques moulées de matière plastique	693
BASCOULERGUE (P.). — Voir PELLISSIER (A.).	
BEAUCHAMP (H.). — Voir FAUCONNIER (B.).	
BEERENS (H.). — Procédé de différenciation entre <i>Spherophorus necrophorus</i> (Schmorl 1891) et <i>Spherophorus funduliformis</i> (Halle 1898)	384
— et GUILLAUME (J.). — Technique de détermination de la sensibilité des bactéries anaérobies aux antibiotiques par la méthode des disques	781
BELJANSKI (M.) et GUELFI (J.). — Etude à l'aide du ^{32}P de l'accumulation des acides nucléiques chez <i>S. aureus</i> et <i>S. enteritidis</i> résistants et sensibles à la streptomycine	115
BÉNAZET (F.), BROTTES (H.), THIVOLET (J.) et SOHIER (R.). — Etude comparée de la réaction d'immobilisation de Nelson-Meyer et des réactions de fixation du complément effectuées avec les antigènes tréponémiques et les antigènes cardiolipidiques.	674

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

799

BERTOYE (A.). — Voir SÉDALLIAN (P.).	
— Voir VIALLIER (J.).	
BERTRAND (Gabriel) et SILBERSTEIN (L.). — Sur la teneur en manganèse des Phanérogames	370
— Nouvelles recherches sur la teneur en manganèse des Phanérogames	372
BOYER (F.). — Voir CHEDID (L.).	
BRESSOU (M.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).	
BRETEY (J.). — Voir NÈGRE (L.).	
BRISOU (J.). — Etude d'espèces et de variétés nouvelles d' <i>Achromobacter</i> isolées du milieu marin	118
— et PRÉVOT (A.-R.). — Etudes de systématique bactérienne. X. Révision des espèces réunies dans le genre <i>Achromobacter</i>	722
BROTTE (H.). — Voir BÉNAZET (F.).	
BUTTIAUX (R.). — Voir LE MINOR (S.).	
CADORE (F. DE). — Voir HUET (M.).	
CALMELS (J.). — Voir PILLET (J.).	
CHABANIER (G.). — Voir PILLET (J.).	
CHAMBON (L.) et LAJUDIE (P. DE). — Etude du métabolisme du bacille de Whitmore	759
CHAUMONT (L.). — Voir PONTIERI (G.).	
CHEDID (L.), BOYER (F.) et SAVIARD (M.). — Nouveaux aspects de l'action antitoxique de la cortisone	347
CHEYROUX (M.). — Toxine téstanique et formol	356
CORDIER (G.) et HAROUNI (B.). — L'ovoculture appliquée à l'isolement des leptospires dans la leptospirose bovine	523
COUTEAU (M.). — Voir DROUHET (E.).	
DANIEL (Ph.). — Voir VIGNAIS (P.).	
DELAUNAY (A.) et DUKE DE BERNONVILLE (C.). — Modifications du pouvoir déchaînant d'un extrait de tissu, chez des animaux sensibilisés à cet extrait, sous l'influence du salicylate de sodium	518
DELAUNAY (A.) et LEBRUN (J.). — Inhibition de la diapédèse leucocytaire et lésions viscérales observées chez des animaux soumis à une hypothermie expérimentale.	520
DESBORDES (J.) et FOURNIER (E.). — Action des substances colorantes sur les Mycobactéries. I. Colorants basiques	657
DÉTOLLE (P.). — Voir SÉDALLIAN (P.).	
DROUHET (E.) et COUTEAU (M.). — La détermination des <i>Candida</i> . Etude des caractères morphologiques et physiologiques de 78 souches isolées de prélèvements pathologiques.	602
— Voir MARIAT (F.).	
DUKE DE BERNONVILLE (C.). — Voir DELAUNAY (A.).	
EYQUEM (A.). — Voir GRJEBINE (A.).	
— Voir FINE (J.).	

FAGUET (M.). — Influence du cobalt sur la multiplication de <i>Staph. aureus</i> et sur l'activité antistaphylococcique de la pénicilline	296
FAUCON (R.). — Voir FOURNIER (J.).	
FAUGONNIER (B.). — Développement du virus grippal et pH du liquide allantoïque. II. Réceptivité de la membrane chorio-allantoïque et développement du virus suivant l'âge de l'embryon et le pH du liquide allantoïque.	710
— et BEAUCHAMP (H.). — Etudes sur les périodes de virémie chez la souris inoculée de virus grippal.	660
FICQ (A.). — Voir GAVOSTO (F.).	
FINE (J.), GROULADE (J.) et EYQUEM (A.). — Etude par microélectrophorèse sur papier du sérum de <i>Vipera aspis</i> et <i>Vipera ursini</i>	378
— Voir GRJEBINE (A.).	
FLORENT (A.). — Voir THOUVENOT (H.).	
FOUACE (J.). — Voir WAHL (R.).	
FOURNIER (E.). — Voir DESBORDES (J.).	
— FAUCON (R.), MIFFRED (L.) et SCHNEIDER (R.). — Isolement de <i>Salmonella Montevideo</i> pour la première fois au Viet-Nam.	382
GALLUT (J.). — Contribution à l'étude de la toxine cholérique : variation du pouvoir toxique de <i>V. cholerae</i> (Ogawa) au cours de la maladie.	561
GARIN (J.-P.). — Voir SÉDALLIAN (P.).	
GAVOSTO (F.) et FICQ (A.). — Etude auto-radiographique sur la localisation cellulaire du virus de la mosaïque du tabac, utilisé comme antigène	320
— Etude auto-radiographique de l'incorporation de la glycine- ^{14}C , lors de la synthèse des anticorps.	425
GEOFFROY (M.). — Voir GUILLAUMIE (M.).	
GIUNTI (J.) et EDLINGER (E.). — Obtention de coupes très minces pour la microscopie électronique par une méthode utilisant la dilatation thermique.	671
— Voir PRÉVOT (A.-R.).	
GLADILINE (C.). — Voir TOUMANOFF (C.).	
GORDEEFF (A.). — Voir VERMEIL (C.).	
GRJEBINE (A.), EYQUEM (A.) et FINE (J.). — Utilisation d'hémagglutinines pour l'identification de l'origine spécifique des hématies ingérées par les moustiques hématophages.	741
GROULADE (J.). — Voir FINE (J.).	
GUÉLIN (A.). — La contamination des poissons et le problème des eaux polluées	303
GUILLAUME (J.). — Voir BEERENS (H.).	
GUILLAUMIE (M.), KREGUER (A.) et GEOFFROY (M.). — Nouvelles recherches sur l'évaluation de l'activité anti- <i>histolyticum</i> et anti- <i>septicum</i> de divers sérums.	38

GUILLAUMIE (M.), KREGUER (A.) et GEOFFROY (M.). — Activité anti-toxique du sérum des animaux ayant reçu pendant quelques mois des injections de toxine <i>septicum</i> ou d'anatoxine <i>histolyticum</i> , puis des injections simultanées de toxine <i>septicum</i> et d'anatoxine <i>histolyticum</i>	197
— — — Anomalies observées au cours du titrage des sérum anti-œdematiens.	285
— — — Pouvoir neutralisant des sérum étalons anti-œdématisiens, anti- <i>septicum</i> et anti- <i>histolyticum</i>	418
GUYOTJEANNIN (C.). — Voir LUTERAAN (Ph.-J.).	
HADDAD (N.). — Voir VERMEIL (C.).	
HAMELIN (A.). — Voir VAISMAN (A.).	
HAROUNI (B.). — Voir CORDIER (G.).	
HAUDUROY (P.). — Mécanisme de formation des formes filtrables et invisibles.	395
— et ROSSET (W.). — Nouvelles observations sur le diagnostic bactériologique de la nature des « bécégites »	772
HUET (M.) et CADORE (F. DE). — Technique d'isolement des anaérobies uréolytiques. Description d'une espèce nouvelle isolée par cette méthode	241
JACOB (F.). — Biosynthèse induite et mode d'action d'une pyocine antibiotique de <i>Pseudomonas pyocyanea</i>	149
JACOBELLI (G.). — Voir VILLECOURT (P.).	
JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). — Sur la transmission expérimentale de la brucellose au rat blanc.	29
— — — Essai de traitement par quelques antibiotiques de la brucellose expérimentale du rat blanc.	101
— — — Remarquable affinité pour l'épiploon d'une souche de <i>Br. abortus</i>	515
— — et VIRAT (B.). — Sur un cas de myxomatose chez le lièvre.	105
— — — De quelques voies d'inoculation du virus du myxome infectieux.	374
— LEVADITI (J.), VALLÉE (A.) et VIRAT (B.). — Un cas de généralisation du fibrome infectieux de Shope.	247
JEZIERSKI (A.). — Voir BARSKI (G.).	
JOYEUX (Y.). — Voir NICOLLE (J.).	
KAPLAN (A. S.). — Voir LWOFF (A.).	
KRÉGUER (A.). — Voir GUILLAUMIE (M.).	
LAJUDIE (P. DE). — Voir CHAMBON (L.).	
LAMY (L.) et LAMY (H.). — Données actuelles sur le parasitisme intestinal et sanguin des différentes populations africaines à Brazzaville.	465
LAVERGNE (D.). — Signification et interprétation de la numération sur plaques des germes telluriques	503
LEBRUN (J.). — Voir DELAUNAY (A.).	

LEFROU (G.) et MARTIGNOLES (J.). — Contribution à l'étude des propriétés du venin d'un vipéridé africain, <i>Echis carinatus</i>	446
LE MINOR (S.), LE MINOR (L.), NICOLLE (P.) et BUTTIAUX (R.). — Etudes sur les <i>E. coli</i> isolés au cours des gastro-entérites infantiles. Propriétés biochimiques et antigéniques.	204
LÉPINE (P.) et RUYCK (R. DE). — Mise en évidence du pouvoir hémagglutinant du virus choriotrope.	412
LÉPINE (P.). — Voir BARSKI (G.).	
LEVADITI (J.). — Voir JACOTOT (H.).	
LIMET-PILOZ (G.). — Voir SÉDALLIAN (P.).	
LINZ (R.). — La multiplication de <i>M. tuberculosis</i> en présence de streptomycine.	334
LOISELEUR (J.). — Les synthèses chimiques réalisées par les rayons X et par d'autres agents physiques peroxydants (rayons ultraviolets et ultrasons)	262
LUTERAAN (Ph. J.) et GUYOTJEANNIN (C.). — Application de la méthode de Feulgen-Rossenbeck aux cultures sur lames gélosées.	253
LWOFF (A.), KAPLAN (A. S.) et RITZ (E.). — Recherches sur la lyso-générisation de <i>S. typhi murium</i>	127
MACDONALD (A.). — Voir BARSKI (G.).	
MACHEBOËUF (M.). — Voir TALWAR (G. P.).	
— Voir VIGNAIS (P.).	
MARIAT (F.). — Physiologie des actinomycètes aérobies pathogènes. I.	479
— et DROUHET (E.). — Sporotrichose expérimentale du hamster.	485
MARTIGNOLES (J.). — Voir LEFROU (G.).	
MAURIN (J.). — Recherches sur l'existence de la fièvre Q en Tunisie par la réaction de déviation du complément.	69
— Voir RENOUX (G.).	
MIFFRED (L.). — Voir FOURNIER (J.).	
NÉEL (R.) et BALTAZARD (M.). — Mise au point d'une réaction d'hémagglutination protéïnique pour la peste.	18
NÈGRE (L.). — Etude comparative du développement et du nombre des bacilles tuberculeux virulents de surinfection dans les divers organes de cobayes et de lapins vaccinés par le BCG et de témoins non vaccinés.	1
— et BRETEY (J.). — Les bacilles de Koch incomplètement évolués dans la bacillémie, au cours de la tuberculose expérimentale du cobaye et du lapin.	681
NEYRA-RAMIREZ (J.). — Etude de l'action du BCG sur la formule leucocytaire et la phagocytose dans l'exsudat péritonéal de cobayes inoculés avec des bacilles de Stefansky vivants ou morts.	84
NICOLLE (J.), JOYEUX (Y.) et WALLE (J.). — Vitesse de déshydrogénération des formes α et β des oses. Cas des xyloses.	663

NICOLLE (P.). — Voir LE MINOR (S.).	
ORTA (B.). — Voir PILLET (J.).	
PAVLATOU (M.) et SLIZEWICZ (P.). — Détermination de la taille de quelques bactériophages par ultracentrifugation	529
PELLISSIER (A.). — Isolement d'un virus encéphalomyélitique à Brazzaville. II. Etude immunologique.	53
— III. Culture sur œuf embryonné et conclusions.	227
— Le virus « cobaye pulmonaire », agent d'une pneumonie spontanée du cobaye. Son incidence en pathologie humaine	702
— AUDEBAUD (G.) et BASCOULERGUE (P.). — Evolution des anticorps déviant le complément pour le virus poliomylétique chez les Africains de Brazzaville.	511
PÉNAU (H.), PEYRÉ (M.) et VELU (H.). — Sur un mode de multiplication des <i>Streptomyces</i>	527
— — — Sporogenèse de <i>Streptomyces griseus</i> en culture profonde	669
PEYRÉ (M.). — Voir PÉNAU (H.).	
PIÉCHAUD (D.). — Voir RUBINSTEN (S.).	
PIÉCHAUD (M.). — La coloration sans hydrolyse du noyau des bactéries	787
— Voir PRÉVOT (A.-R.).	
PILLET (J.), CALMELS (J.), ORTA (B.) et CHABANIER (G.). — Etude comparée du type sérologique, de la sensibilité aux bactériophages et de l'antibiogramme de 201 souches de staphylocoques isolés par prélèvements systématiques chez le nourrisson.	309
— et ORTA (B.). — Recherches sur la composition antigénique des staphylocoques non pathogènes. I.	752
PITRE (J.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).	
PONTIERI (G.) et CHAUMONT (L.). — Action de divers antiseptiques sur le virus du fibrome de Shope.	532
PRÉVOT (A. R.) et THOUVENOT (H.). — Valeur de l'azide de sodium pour l'isolement des anaérobies.	236
— — A propos du pouvoir pathogène de <i>Staph. asaccharolyticus</i> Distaso	667
— GIUNTINI (J.) et THOUVENOT (H.). — Recherches sur l'organe giratoire de <i>Fusocillus girans</i>	774
— PIÉCHAUD (M.) et THOUVENOT (H.). — Etude d'une souche de <i>Cilllobacterium spatuiforme</i> (Distaso) P. 1940	776
— THOUVENOT (H.), PITRE (J.) et BRESSOU (M.). — Etude d'une espèce thermophile anaérobie nouvelle : <i>Cilllobacterium thermophilum</i> n. sp.	778
— Voir BRISOU (J.).	
RADEJ (N.). — Voir SIBALIC (S.).	
RENOUX (G.). — Anticorps bloquant dans le sérum de sujets brucéliques. IV et V.	91 et 232

RENOUX (G.) et MAURIN (J.). — Fièvre Q et brucellose.	112
RITZ (E.). — Voir LWOFF (A.).	
RIVALIER (E.). — Description de <i>Sabouraudites praecox</i> n. sp. suivie de remarques sur le genre <i>Sabouraudites</i> .	276
ROLLAND (M.). — Voir THIVOLET (J.).	
ROSSET (W.). — Voir HAUDUROY (P.).	
ROUBAUD (E.). — Expériences d'intercroisement de glossines (tsé-tsés) du groupe <i>Gl. palpalis</i> effectuées à l'Institut Pasteur de Paris	537
RUBINSTEIN (S.) et PIÉCHAUD (D.). — Quelques caractères de <i>Shigella sonnei</i> et <i>Shigella boydii</i> 6. Leur valeur pour le diagnostic différentiel.	250
RYCK (R. de). — Voir LÉPINE (P.).	
SAVIARD (M.). — Voir CHEDID (L.).	
SCHNEIDER (R.). — Voir FOURNIER (J.).	
SÉDALLIAN (P.), BERTOYE (A.), DÉTOLLE (P.), LIMET-PILOZ (G.) et GARIN (J. P.). — Sur un virus d'origine méningitique, apparenté au virus d'Armstrong, mais anormal par sa résistance, ses dimensions et sa répartition dans l'organisme.	785
SIBALIC (S.) et RADEJ (N.). — Un nouveau milieu de culture pour le dosage microbiologique du tryptophane	793
SILBERSTEIN (L.). — Voir BERTRAND (Gabriel).	
SLIZEWICZ (P.). — Etude par ultracentrifugation du sérum de cheval	189
— Action de la chaleur sur le sérum de cheval.	458
— Voir BARSKI (G.).	
— Voir PAVLATOU (M.).	
SOHIER (R.). — Voir BÉNAZET (F.).	
STAUB (A. M.). — Rôle des anticorps antipolyosidiques dans l'agglutination des bacilles typhiques	618
TALWAR (G. P.) et MAGHEBOUF (M.). — A propos des travaux de Bresler sur la synthèse des protéines sous hautes pressions.	169
THIVOLET (J.) et ROLLAND (M.). — Influence de l'agitation mécanique sur la fixation de l'anticorps immobilisant.	109
— Voir BÉNAZET (F.).	
THOUVENOT (H.). — Voir PRÉVOT (A. R.).	
— et FLORENT (A.). — Etude d'un anaérobiose du sperme du taureau et du vagin de la vache, <i>Vibrio bubulus</i> Florent, 1953.	237
TOUMANOFF (C.). — L'action de <i>B. cereus</i> var. <i>alesti</i> Toum. et Vago, sur les chenilles de <i>Galleria melonella</i> L et <i>Hypomeuta cognatella</i> H. B.	570
— VAGO (C.) et GLADILINE (C.). — Recherches sur l'effet toxique de <i>B. cereus</i> var. <i>alesti</i> . II.	438
VAGO (C.). — Voir TOUMANOFF (C.).	

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

805

VAISMAN (A.) et HAMELIN (A.). — Immunité et spécificité des immobilisines récurrentielles entre <i>Borrelia duttoni</i> et <i>Borrelia hispanica</i>	107
VALLÉE (A.). — Voir JACOTOT (H.)	
VELU (H.). — Voir PÉNAU (H.)	
VERMEIL (G.), GORDEEFF (A.) et HADDAD (N.). — Un cas tunisien de mycose généralisée mortelle.	636
VIALLIER (J.) et BERTOYE (A.). — Mélanges de Mycobactéries dans certains produits pathologiques. Intérêt de leur séparation.	376
VIETTE (M.). — Réactions d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée dans la lèpre.	76
VIGNAIS (P.) et MACHEBOËUF (M.). — Influence des hautes pressions hydrostatiques sur l'action enzymatique de la ribonucléase.	180
— — Influence des hautes pressions hydrostatiques sur l'hydrolyse enzymatique d'une protamine en présence et en absence d'acide ribonucléique.	401
VIGNAIS (Paulette) et VIGNAIS (Pierre). — Hautes pressions et enzymes microbiens.	386
— BARBU (E.), DANIEL (Ph.) et MACHEBOËUF (M.). — Actions comparées de la chaleur et de la pression hydrostatique sur les antigènes de <i>S. paratyphi C</i>	647
VILLECOURT (P.) et JACOBELLI (G.). — Bactéries pathogènes ou saprophytes transformant le glucose en acide gluconique. .	493
VIRAT (B.). — Voir JACOTOT (H.)	
WAHL (R.). — Les effets inhibiteurs des phages sur la croissance des cultures bactériennes et la notion d'efficacité d'une race de phages sur une souche de bactéries.	589
— Evaluation de l'« efficacité » d'une race de phages sur une souche de bactéries	729
— et FOUCHE (J.). — Isolement et emploi de phages nouveaux pour identifier les souches de Staphylocoques insensibles aux phages classiques	101
WALLE (J.). — Voir NICOLLE (J.)	

TABLE ANALYTIQUE
DU TOME 86

<i>Achromobacter</i> . Espèces et variétés nouvelles d'— isolées du milieu marin.	118
— Voir aussi <i>Systématique</i> .	
<i>Acides nucléiques</i> . Etude à l'aide du ^{32}P de l'accumulation des — — chez <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Salmonella enteritidis</i> résistants et sensibles à la streptomycine.	115
<i>Actinomycètes</i> . Physiologie des — aérobies pathogènes. I.	479
<i>Anaérobies</i> . Valeur de l'azide de sodium pour l'isolement des — .	236
— Etude d'un — du sperme de taureau et du vagin de la vache. .	237
— Technique d'isolement des — uréolytiques. Description d'une espèce nouvelle	241
— Procédé de différenciation entre <i>Sphaerophorus necrophorus</i> et <i>Sph. funduliformis</i>	384
— L'organe giratoire de <i>Fusocillus girans</i>	774
— Etude d'une espèce — thermophile nouvelle, <i>Cillobacterium thermophilum</i> , n. sp.	776
— Etude d'une souche de <i>Cillobacterium spatuliforme</i>	778
— Voir aussi <i>Antibiotiques, Sérum</i> .	
<i>Anaphylaxie</i> . Modifications du pouvoir déchaînant d'un extrait de tissu sous l'influence du salicylate de sodium.	518
<i>Antibiotiques</i> . Détermination de la sensibilité des anaérobies aux — par la méthode des disques.	781
— Voir aussi <i>Brucellose</i> .	
<i>Anticorps</i> . Rôle des — antipolyosidiques dans l'agglutination des bacilles typhiques	618
— Voir <i>Synthèses</i> .	
<i>Antigènes</i> . Actions comparées de la chaleur et de la pression sur les — de <i>S. paratyphi C</i>	647
<i>Autoradiographie</i> . Voir <i>Mosaïque, Synthèses</i> .	
<i>BCG</i> . Voir <i>Tuberculose</i> .	
<i>Bacille de Koch</i> . Voir <i>Tuberculose</i> .	
<i>Bacille de Whitmore</i> . Métabolisme du — —	759
<i>Bacillus cereus</i> . Effet toxique de — — var. <i>alesti</i>	438
— Action de — — sur les Chenilles de <i>Galleria melonella</i> et <i>Hypomeuta cognatella</i>	570
<i>Bactéries</i> . Mécanisme de formation des formes visibles et invisibles des —	395

<i>Bactéries.</i> — pathogènes ou saprophytes transformant le glucose en acide gluconique	493
<i>Bactériophages.</i> Recherches sur la lysogénisation de <i>S. typhi murium</i>	127
— Isolement et emploi de — nouveaux pour identifier les staphylocoques insensibles aux — classiques	161
— Détermination de la taille de quelques — par ultracentrifugation	529
— Effets inhibiteurs des — sur la croissance des cultures bactériennes et la notion « d'efficacité » d'une race de —	589
— Evaluation de « l'efficacité » d'une race de — sur une souche de bactéries	729
— Voir aussi <i>Eaux</i> .	
<i>Brucellose.</i> Transmission expérimentale de la — au rat blanc	29
— Anticorps bloquant dans le sérum de sujets brucelliques. IV et V.	91 et 232
— Traitement de la — expérimentale par les antibiotiques	101
— Remarquable affinité pour l'épiploon d'une souche de <i>Br. abortus</i>	515
— Voir aussi <i>Fièvre Q.</i>	
<i>Chaleur.</i> Voir <i>Antigènes</i> .	
<i>Champignons.</i> Description de <i>Sabouraudites praecox</i> n. sp.	276
— Un cas tunisien de mycose généralisée	636
<i>Choléra.</i> Variation du pouvoir toxique de <i>V. cholerae</i> (Ogawa) au cours de la maladie	561
<i>Cobalt.</i> Influence du — sur la multiplication de <i>Staph. aureus</i> et sur l'activité antistaphylococcique de la pénicilline	296
<i>Cobaye.</i> Le virus « — pulmonaire »	702
<i>Cortisone.</i> Nouveaux aspects de l'action antitoxique de la —	347
<i>Cultures cellulaires.</i> Voir <i>Poliomyélite</i> .	
<i>Déshydrogénération.</i> Vitesse de — des formes α et β des oses. Cas des xyloses	663
<i>Diapédèse.</i> Inhibition de la — leucocytaire et lésions viscérales chez les animaux en hypothermie expérimentale	520
<i>Eaux.</i> La contamination des poissons et le problème des — polluées	303
<i>Escherichia coli.</i> Etude des — — isolés au cours des gastro-entérites infantiles	204
<i>Encéphalomyélite.</i> Isolement d'un virus encéphalomyélétique à Brazzaville. II. Etude immunologique. III. Culture sur œuf embryonné et conclusions	53 et 227
<i>Enzymes.</i> Voir <i>Pressions</i> .	
<i>Fibrome.</i> Un cas de généralisation du — de Shope	247
— Action de divers antiseptiques sur le virus du — de Shope	532
<i>Fièvre Q.</i> Recherches sur l'existence de la — — en Tunisie par la déviation du complément	69
— — et brucellose	112

<i>Glossines.</i> Expériences d'intercroisement de — du groupe	537
<i>Gl. palpalis</i>	
<i>Grippe.</i> Les périodes de virémie chez la souris inoculée de virus	660
grippal	
— Développement du virus grippal et pH du liquide allantoïque. II	710
<i>Hémagglutination.</i> Voir <i>Lèpre, Peste, Virus.</i>	
<i>Hémagglutinines.</i> Utilisation des — pour l'identification de l'origine spécifique des hématies ingérées par les moustiques hématoophages	741
<i>Hématies.</i> Voir <i>Hémagglutinines, Virus.</i>	
<i>Immobilisines.</i> Immunité et spécificité des — récurrentielles entre	
<i>Borrelia duttoni</i> et <i>B. hispanica</i>	107
— Influence de l'agitation mécanique sur la fixation des —	109
<i>Lèpre.</i> Réactions d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée dans la —	76
— Action du BCG sur la formule leucocytaire et la phagocytose chez le cobaye infecté de bacille de Stefansky	84
<i>Leptospirose.</i> L'ovoculture appliquée à l'isolement des leptospires dans la — bovine	523
<i>Levures.</i> La détermination des <i>Candida</i>	602
<i>Manganèse</i> La teneur en — des Phanérogames. I	370
— II. Nouvelles recherches sur la teneur en — des Phanérogames	372
<i>Méningite.</i> Un virus d'origine méningitique apparenté au virus d'Armstrong	785
<i>Microscopie électronique.</i> Obtention de coupes très minces pour la — — par la dilatation thermique	671
— Voir aussi <i>Anaérobies.</i>	
<i>Milieux de culture.</i> Nouveau — — — pour le dosage microbiologique du tryptophane	793
<i>Mosaïque du tabac.</i> Etude autoradiographique sur la localisation cellulaire du virus de la — — — utilisé comme antigène	320
<i>Mycobactéries.</i> Mélanges de — dans certains produits pathologiques. Intérêt de leur séparation	376
— Action des substances colorantes sur les —	657
<i>Mycose.</i> Voir <i>Champignons.</i>	
<i>Myxomatose.</i> Un cas de — chez le lièvre	105
— Quelques voies d'inoculation du myxome infectieux	374
<i>Noyau.</i> Coloration sans hydrolyse du — des bactéries	787
— Voir aussi <i>Techniques.</i>	
<i>Numération.</i> Signification et interprétation de la — sur plaque des germes telluriques	503
<i>Parasitisme.</i> — intestinal et sanguin des Africains de Brazzaville	465
<i>Peste.</i> Réaction d'hémagglutination protéinique pour la —	18
<i>Poliomyélite.</i> Sensibilité au virus de la — <i>in vitro</i> des tissus de différentes espèces de singes d'Afrique centrale. Non-réceptivité des tissus de certains mammifères	243

<i>Poliomyélite</i> . Anticorps déviant le complément pour le virus de la — type 2 chez les Africains de Brazzaville.	511
— Persistance du virus de la — dans le suc gastrique humain.	579
— Microméthode de séroneutralisation de la — en cultures cellulaires sur plaques de matière plastique.	693
<i>Pressions</i> . Hautes — et enzymes microbiens.	386
— Hautes — et hydrolyse enzymatique d'une protamine.	401
— Voir aussi <i>Antigènes</i> , <i>Protéines</i> , <i>Ribonucléase</i> .	
<i>Protamine</i> . Voir <i>Pressions</i> .	
<i>Protéines</i> . A propos des travaux de Bresler sur la synthèse des — sous hautes pressions	169
<i>Pyocine</i> . Biosynthèse induite et mode d'action d'une — antibiotique de <i>Pseudomonas pyocyanea</i> .	149
<i>Rayons ultra-violets</i> . Voir <i>Synthèses</i> .	
<i>Rayons X</i> . Voir <i>Synthèses</i> .	
<i>Ribonucléase</i> . Influence des hautes pressions sur l'action enzymatique de la —	180
<i>Salmonelles</i> . Isolement de <i>S. Montevideo</i> pour la première fois au Viet - Nam	382
— Voir aussi <i>Anticorps</i> , <i>Bactériophages</i> .	
<i>Sérums</i> . Evaluation de l'activité anti- <i>histolyticum</i> et anti- <i>septicum</i> de divers —	38
— Activité antitoxique du — des animaux ayant reçu des injections de toxine <i>septicum</i> et d'anatoxine <i>histolyticum</i> .	197
— Anomalies observées au cours de titrages des — anti-œdematiens	285
— Pouvoir neutralisant des — étalons anti-œdematiens, anti- <i>septicum</i> et anti- <i>histolyticum</i> .	418
— Etude par ultracentrifugation du — de cheval.	189
— Action de la chaleur sur le — de cheval.	458
<i>Shigelles</i> . Quelques caractères de <i>Sh. sonnei</i> et <i>Sh. boydii</i> 6. Leur valeur pour le diagnostic différentiel.	250
<i>Silico-gel</i> . Préparation d'un — — ensemencable en surface et en profondeur	765
<i>Sol</i> . Voir <i>Numération</i> .	
<i>Sporotrichose</i> . — expérimentale du hamster	485
<i>Staphylocoque</i> . Etude comparée du type sérologique, de la sensibilité aux bactériophages et de l'antibiogramme de 201 souches de —	309
— Pouvoir pathogène de <i>Staphylococcus asaccharolyticus</i> Distaso.	667
— Composition antigénique des — non pathogènes.	752
<i>Streptomyces</i> . Un mode de multiplication des —	527
<i>Streptomyces griseus</i> . Sporogenèse de — — en culture profonde.	669
<i>Streptomycine</i> . Voir <i>Tuberculose</i> .	
<i>Synthèses</i> . Les — chimiques réalisées par les rayons X et par d'autres agents physiques peroxydants.	262

<i>Synthèses.</i> Autoradiographie de l'incorporation de la glycine- ^{14}C , lors de la — des anticorps	425
<i>Syphilis.</i> Comparaison des réactions d'immobilisation et de fixation du complément	674
<i>Systématique.</i> Révision des espèces réunies dans le genre <i>Achromobacter</i>	722
<i>Techniques.</i> Application de la — de Feulgen-Rossenbeck aux cultures sur lames gélosées	253
<i>Tétanos.</i> Toxine tétanique et formol	356
<i>Tuberculose.</i> Développement des B. K. virulents de surinfection dans les organes des animaux vaccinés par le BCG et chez les témoins.	1
— La multiplication de <i>M. tuberculosis</i> en présence de streptomycine	334
— Les B. K. incomplètement évolués dans la bacillémie au cours de la — expérimentale.	681
— Diagnostic bactériologique de la nature des bécigites.	772
<i>Ultracentrifugation.</i> Voir <i>Sérum, Bactériophages</i> .	
<i>Ultrasons.</i> Voir <i>Synthèses</i> .	
<i>Venin.</i> Propriétés du — d' <i>Echis carinatus</i>	446
<i>Vipères.</i> Etude par microélectrophorèse du sérum de <i>V. aspis</i> et <i>V. ursini</i>	378
— Voir <i>Venin</i> .	
<i>Virus.</i> Mise en évidence du pouvoir hémagglutinant du — choriotope.	412
— Voir aussi <i>Méningite et aux différents virus</i> .	

Le Gérant : G. MASSON.